



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج  
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.  
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون  
قسم العلوم البيولوجية  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers  
Département des Sciences Biologiques



UNIVERSITÉ MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

UNIVERSITY MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI  
BORDJ BOU ARRERIDJ

# Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

## Thème

**Contribution à l'étude phytochimique et l'activité  
antiradicalaire de la plante *Majorana hortensis***

Présenté par : Guendouz Fatima  
Touahria Hanane

Devant le jury :

Président :	M <sup>me</sup> Fatmi W.	MCB (Université de Bordj Bou Arreridj)
Encadrant :	M <sup>me</sup> Benouadah Z.	MCB (Université de Bordj Bou Arreridj)
Examineur 1 :	M <sup>me</sup> Nassri M.	MAB (Université de Bordj Bou Arreridj)

Année universitaire : 2018/2019

# **Remerciements**

*Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans la volonté de **DIEU**, qui nous a offert santé, force, patience et volonté jusqu'au dernier moment. Nous remercions, **DIEU**, Le Tout Puissant d'avoir nous aidé de finaliser ce travail.*

*Il ne nous serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à Madame Benouadah Zohra d'avoir accepté de nous encadrer, pour sa gentillesse, ses conseils et ses précieuses orientations.*

*Nous exprimons nos vifs remerciements à Mme Fatmi Widad et Mme Nasri Merieme, d'avoir accepté de juger notre travail.*

*Nous voudrions adresser un remerciement particulier plein de reconnaissance et de gratitude à Mme Guergour et Mme Mezziti.*

*Nous adressons nos plus vifs remerciements aux personnels du laboratoire de chimie pour leur assistance et leur sympathie.*

*Enfin, nos sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.*

# *Dédicace*

*Je tiens à dédier ce modeste travail d'abord :*

*A mes Parents, sans qui, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci pour tout leur amour et leur soutien depuis toujours. Ils ont su me donner toutes les chances pour réussir. Qu'ils trouvent dans la réalisation de ce travail, la conséquence de leurs efforts ainsi que l'expression de me*

*Plus affectueuse gratitude.*

*A mes frères Ridha, Abd Elkarim, Youssef et Younes qui ont toujours été présents pour moi. Merci pour votre encouragement et confiance.*

*A mes cousines Hanane, Widad, Souad, Amina, Ahlam et khawla*

*Ainsi qu'à tous mes amis Fatima, Imane, Marbouha, Bouchra, Faiza,*

*Amel, Dallele, Messkia et Amira.*

*Et tous les gens que je connais.*

*Hanane*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents **Guendouz Lakhdar et Touahria Khadidja**, sources  
constantes d'encouragement,  
de soutien, de confiance et d'affection.*

*A mes frères Abdennour, Omar, Laid et Abderrahim.*

*A mes sœurs Soriya, Merzaka, Khawla et Ferial.*

*A ma cousine Souhila.*

*A mes amies Hanane T, Hanan S, Imen, Dallel, Amal, Amira, Hania, Wissam,  
Merbouha, Bouchra, Chahera, Aïcha, Faïza et Radja.*

*Et tous les gens que je connais.*

*Fatima*

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I :</b> Composition chimique de <i>Majorana hortensis</i> .....	05
<b>Tableau II :</b> Composition de l'huile essentielle de la marjolaine.....	05
<b>Tableau III :</b> les rendements des extraits de <i>Majorana hortensis</i> .....	20
<b>Tableau IV:</b> Détection des tanins.....	21
<b>Tableau V :</b> Détection des alcaloïdes.....	22
<b>Tableau VI:</b> Détection des anthocyanes.....	23
<b>Tableau VII :</b> Détection des coumarines.....	23
<b>Tableau VIII :</b> Détection des stérols.....	24
<b>Tableau IX :</b> Détection des triterpènes.....	25
<b>Tableau X:</b> Détection des saponosides.....	26
<b>Tableau XI :</b> Dosage des polyphénols totaux dans les extraits de <i>Majorana hortensis</i> .....	27
<b>Tableau XII :</b> Dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits de <i>Majorana hortensis</i> .....	29
<b>Tableau XIII :</b> Test de réduction du radical DPPH° par les extraits méthanoliques et l'acide ascorbique.....	31

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La plante <i>Majorana hortensis</i> .....	03
<b>Figure 2</b> : Aire de distribution du genre <i>Origanum</i> .....	04
<b>Figure 3</b> : Origine des différents radicaux oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	08
<b>Figure 4</b> : Les systèmes de défense contre les radicaux libres.....	11
<b>Figure 5</b> : La plante <i>Majorana hortensis</i> sèche.....	11
<b>Figure 6</b> : La plante <i>Majorana hortensis</i> après leur broyage.....	15
<b>Figure 7</b> : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	19
<b>Figure 8</b> : Les extraits bruts de <i>Majorana hortensis</i> . A : extrait Egyptien, B : extrait Pakistanais .....	20
<b>Figure 9</b> : Détection des tanins.....	21
<b>Figure 10</b> : Détection des alcaloïdes.....	22
<b>Figure 11</b> : Détection des anthocyanes.....	23
<b>Figure 12</b> : Détection des coumarines.....	24
<b>Figure 13</b> : Détection des stérols.....	24
<b>Figure 14</b> : Détection des triterpènes.....	25
<b>Figure 15</b> : Détection des saponosides .....	26
<b>Figure 16</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	27
<b>Figure 17</b> : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	29
<b>Figure 18</b> : Gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique.....	30
<b>Figure 19</b> : Capacité d'inhibition du radical DPPH (IC50) par les extraits méthanoliques et l'acide ascorbique.....	31

## Liste des abréviations

**Abs** : Absorbance.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**DPPH** : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl.

**ECM** : Eléctrochoque maximal.

**EE** : Extrait Égyptien.

**EP** : Extrait Pakistanais.

**ERO** : Espèce Réactive de l'Oxygène.

**ERN** : Espèce Réactive de l'azote.

**GPx** : La glutathions peroxydase.

**HE**: Huile essentielle.

**IC50** : Concentration inhibitrice à 50%.

**kDa** : Kilodalton

**LDL** : Lipoprotéines Low densité.

**mg EAG/ g** : Milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche.

**mg EAQ / g** : Milligramme d'équivalents de la quercétine par gramme de matière sèche.

**MDA** : Malondialdéhyde

**OH** : Radicaux hydroxyles

**PON** : Paraoxonase

**Prxs** : Les peroxyredoxines

**PTZ** : Pentylentetrazole

**RLO** : Radicaux libres oxygénés

**RO** : Radicaux peroxydes

**SOD** : Superoxyde dismutase

**Trx** : Thioredoxin

**UV** : Ultra-violet.

# Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

<b>Introduction</b> .....	01
<i>Synthèse bibliographique</i>	
<b>I. Présentation de la plante <i>Majorana hortensis</i></b> .....	02
I.1. Généralités .....	02
I.2. Description botanique .....	03
I.3. Systématique .....	03
I.4. Distribution géographique et habitat .....	04
I.5. Composition chimiques .....	04
I.6. Les activités biologiques .....	04
I.6.1. Activité antibactérienne et antifongique .....	05
I.6.2. Activité anticonvulsivante .....	05
I.6.3. Activité antidiabétique .....	06
I.6.4. Activité antimutagène .....	06
I.6.5. Activité antistress (anti-anxiété) .....	06
I.6.6. Activité antispasmodique .....	07
I.6.7. Activité antitoxique .....	07
<b>II .Les radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants</b> .....	08
II.1. Les radicaux libres .....	08
II.1.1. Production des radicaux libres .....	08
II.2. Le stress oxydant .....	09
II.2.1. Conséquences du stress oxydant .....	09
II.2.1.1. L'action sur l'ADN .....	09
II.2.1.2. L'action sur les protéines .....	09
II.2.1.3. L'action sur les lipides .....	09
II.2.1.4. L'action sur les carbohydrates .....	10
II.3. Les antioxydants .....	10
II.3.1. Rôle des antioxydants .....	10
II.3.2. Types d'antioxydants .....	11



II.3.2.1. Les antioxydants enzymatiques.....	11
II.3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques.....	11
<b>Partie expérimentale</b> .....	13
<b>III. Matériel et méthodes</b> .....	15
III.1. Matériel végétal.....	15
III.2. Méthodes.....	15
III.2.1. Broyage et tamisage.....	16
III.2.2. Préparation des extraits.....	16
III.2.3. Screening phytochimique.....	16
III.2.4. Analyse quantitative des extraits méthanoliques.....	17
III.2.4.1. Dosage des composés phénoliques.....	17
III.2.4.2. Dosage des flavonoïdes.....	18
III.2.5. Evaluation in vitro de l'activité antiradicalaire.....	18
III.2.6. Traitement statistique .....	19
<b>IV. Résultats et discussion</b> .....	20
IV.1. Le rendement .....	20
IV.2. Screening phytochimique.....	21
IV.3. Analyse quantitative des extraits méthanoliques.....	27
IV.3.1. Teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes.....	27
IV.4. L'activité antiradicalaire .....	30
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	33
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	

# **Introduction**

### Introduction

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité comme remèdes pour le traitement de diverses maladies parce qu'elles contiennent des composants riches en principes thérapeutiques. Ce qu'on appelle le métabolite secondaire (**khaldi et al., 2012**). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population mondiale a recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Chaabi, 2008**).

Le monde scientifique est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, une situation où la cellule ne contrôle plus la quantité de radicaux libres qu'elle produit, entraînant ainsi la plupart des maladies telle que les maladies cardiovasculaire, neurodégénératives et le cancer (**Pincemail et al., 2002**). Le développement de nouveaux antioxydants d'une capacité antioxydante de meilleure qualité et de moindre toxicité s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydation. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antioxydant, si l'on considère que ces plantes peuvent contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires. Ces derniers représentés actuellement par 100.000 substances identifiées, pourraient être utilisés dans la prévention de certaines maladies ou pour une meilleure conservation des aliments (**Cowan, 1999**).

La famille des Labiées (Lamiacées) est connue par sa richesse en taxons producteurs des huiles essentielles, terpènes et composés phénoliques. Le genre *Origanum* se transige de 43 espèces (**Krishnakumar and Potty., 2012**). Parmi les espèces de ce genre, il existe quelques plantes considérées comme étant les plus aromatiques dans le monde végétale, citons la marjolaine (*Majorana hortensis*). Cette espèce appelée vulgairement 'Merdgouche, se développant dans les zones internes semi arides (**Quézel and Santa., 1962**). Le choix d'étudier cette plante a été guidé d'une part par les indications d'usage traditionnel, d'autre part il y a peu d'information chimique et biologique sur cette plante.

Dans ce contexte, les objectifs de la présente étude sont :

- ✓ Réaliser le screening phytochimiques sur les feuilles de la plante *Majorana hortensis* chez deux variétés l'une d'origine Egyptienne et l'autre de Pakistan.
- ✓ Le dosage quantitatif des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux dans l'extrait méthanolique.
- ✓ Evaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de cet extrait.

# **Synthèse bibliographique**

# **I. Présentation de la plante *Majorana hortensis***

### I. Présentation de la plante *Majorana hortensis*

#### I.1. Généralités

La plante *Majorana hortensis* ou la Marjolaine (*Origanum majorana.L*) est une plante annuelle de la famille des Lamiacées, cultivée comme plante condimentaire pour ses feuilles aromatiques. C'est une espèce très proche de l'*Origan commun* (*Origanum vulgare*). Elle est parfois appelée Marjolaine des jardins ou Origan des jardins (**Dubois et al, 2006**). Autres noms communs : marjolaine officinale, marjolaine à coquilles, la marjolaine vraie, Marjolaine française, Sweet Marjolam. Dans l'Afrique du Nord les Arabes la nomment Khrezama (Tunisie), Meurdekouch (Maroc), Mardguscia (Tripojiiaine), et parfois Mazermouch ou Marikoum, noms qui s'appliquent aussi à d'autres espèces d'*Origanum* (**Chevalier, 1938, Dubois et al., 2006**).

Les Egyptiens la cultivaient dans les jardins et employaient ses pousses pour embaumer les momies ; on attribuait aussi à la plante des propriétés médicinales (**Chevalier, 1938**). À la fin du XVI<sup>e</sup> siècle, on la prescrivait «contre les affections dues au refroidissement du cerveau et de la tête » .Ses propriétés furent étudiées au XVII<sup>e</sup> siècle par le Danois Simon Paulli (**Gérard and François., 2009, Chevalier, 1938**).

La marjolaine était à l'origine utilisée par Hippocrate comme agent antiseptique. Pour les anciens Grecs, c'était «Amarakos», symbole d'amour, d'honneur et de bonheur. Aristote a rapporté que c'était un antipoison. Elle était utilisée pour désinfecter et conserver la nourriture et son huile a été massée sur le front et dans les cheveux dans le vieux Egypte.

Traditionnellement, les feuilles de la marjolaine sont utilisées pour soigner le diabète, l'insomnie, catarrhe, asthme et nervosité (**Cano and Volpato., 2004**). Elle est aussi utilisée pour le traitement de troubles gastro-intestinaux, toux, les maladies bronchiques, comme un bain de bouche pour l'hygiène buccale et également appliqué localement pour soulager les symptômes de rhume, comme la congestion nasale (**Bruneton, 1999**).

C'est une maison remède pour infection de la poitrine, toux, mal de gorge, douleurs rhumatismales, troubles nerveux, cardiovasculaires épilepsie, insomnie, soins de la peau, flatulences et troubles de l'estomac (**Bremness, 1994, Yazdanparast and Shahriyary., 2008**). On l'emploie également en cas de migraine. Elle est un excellent antiseptique général, tant interne qu'externe. Très bon antispasmodique, la marjolaine est utilisée contre les mauvaises digestions d'origine nerveuse, les coliques et les flatulences.

En usage externe, elle a depuis longtemps fait ses preuves contre le torticolis et la sciatique (**Gérard and François., 2009**).

Cette herbe s'emploie sous forme de feuilles fraîches ou séchées, seule ou en mélange avec d'autres herbes, pour aromatiser de nombreuses préparations culinaires. Son huile essentielle est connue pour sa propriété antiseptique (Chung, 2001), mais il est à éviter en usage interne pour le risque de la toxicité (Gérard and François., 2009).

### I.2. Description botanique

*Majorana hortensis* (*Origanum Majorana L*) est une plante herbacée à feuilles persistantes (Bimala et al., 2016). C'est une plante annuelle de 20 à 40 cm de hauteur. Ses tiges dressées portent des petites feuilles opposées, arrondies et d'un vert grisâtre. Les fleurs blanches, groupées en épis terminant les tiges et entourées de bractées arrondies caractéristiques. Pour cette raison, on parle souvent de marjolaine à coquilles (figure 1). La plante dégage au froissement une odeur aromatique (Gérard and François., 2009).



Figure 1 : La plante *Majorana hortensis* (Abdalla et al., 2012).

### I.3. Systématique (Gilles, 2007)

Embranchement :	Spermaphytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Gamopétales
Ordre :	Lamiales
Famille :	Lamiaceae
Sous-famille :	Népétoïdées
Genre :	<i>Origanum</i>
Espèce :	<i>Origanum Majorana</i> البردقوش

## I.4. Distribution géographique et habitat

*Majorana hortensis* est actuellement connue seulement à l'état cultivé originaire du sud-ouest de l'Asie probablement de Syrie ou de l'Iran, cultivée depuis la plus haute antiquité dans tout le bassin méditerranéen comme leur genre *Origanum* qui est distribué dans ce climat (figure 2). Elle est une plante vivace en Afrique, mais annuelle dans les jardins de l'Europe moyenne où on la cultive (Chevalier, 1938, Gérard and François., 2009, Ietswaart, 1980).

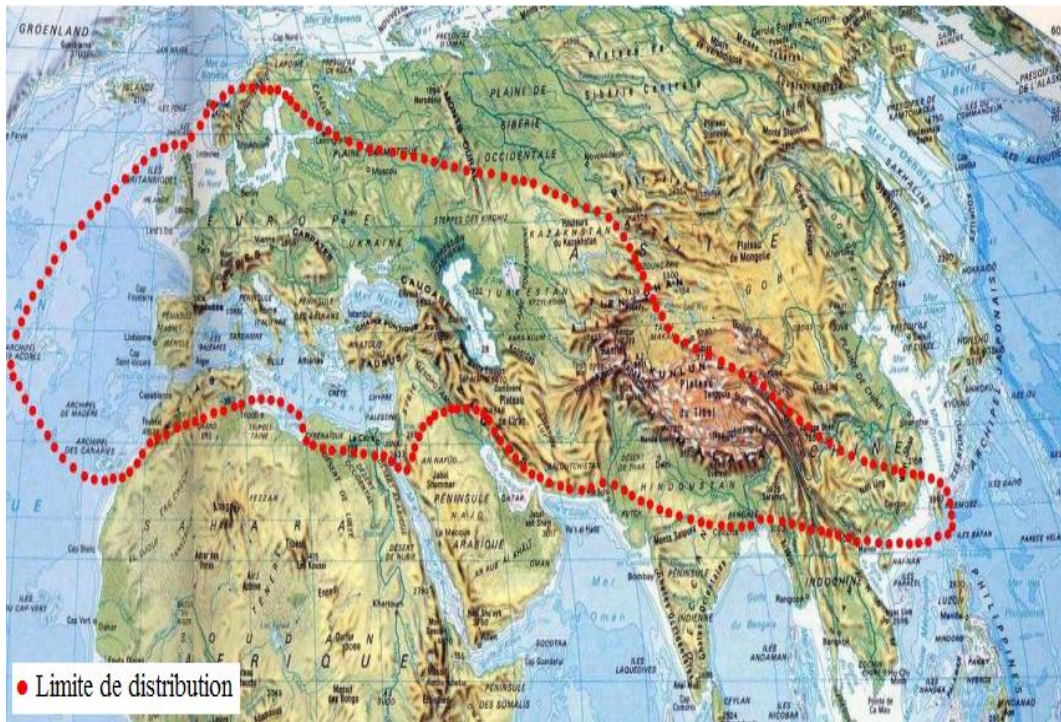


Figure 2 : Aire de distribution du genre *Origanum* (Ietswaart, 1980).

## I.5 .Composition chimiques

Une étude phytochimique sur la plante médicinale *Majorana hortensis* (l'extrait méthanolique et d'éther de pétrole) a montré qu'elle comporte les composés suivants : les glycosides, flavonoïdes, tannins, alcaloïdes et stéroïdes (tableau I) (Bimala, 2016).



**Tableau I :** Composition chimique de *Majorana hortensis* (Bimala, 2016)

Composé chimique	Extrait éthanolique	Extrait d'éther de pétrol
Les alcaloïdes	+	+
Les flavonoïdes	+++	+++
Les saponosides	+	+
Les tanins	++	++
Les phlobatanins	-	-
Les glycosides	+++	+++
Les stérols	+	++
Les résines	++	++
Les phénols	+	++
Les anthraquinones	-	-
Les terpénoïdes	-	-
Les glycosides cardiaques	++	++

D'après **Triantaphyllouk (2001)**, L'huile essentielle de marjolaine est particulièrement riche en terpinéol. Elle a un aspect liquide, limpide, une couleur jaune pâle à foncé et une odeur douce, fine, chaude et délicate. La composition de l'huile essentielle de marjolaine est exprimée en pourcentage de divers composés des familles des monoterpénols, des monoterpènes, des sesquiterpènes et des esters terpéniques (**tableau II**).

**Tableau II :** Composition de l'huile essentielle de la marjolaine (**Triantaphyllouk, 2001**)

Composé	%	Composé	%
terpinén-4-ol	22.85	gamma-terpinène	12.60
(E)-hydrate de sabinène	15.94	Sabinène	7.65
(Z)- paramenth-2-ène-1-ol	1.98	alpha-terpinène	7.73
(E)-para-menth-2-ène-1-ol	1.25	béta-phellandrène	1.90
alpha-terpinéol	4.88	Terpinolène	2.92
(Z)-hydrate de sabinène	4.40	bétapinène	0.43
acétate de linalyle	1.70	bicyclogermacrène	1.22
alpha-thujène	0.77	alpha-pinène	0.77
limonène	1.76	para-cymène	1.57
alphaphellandrène	0.56	béta-caryophyllène	2.49

## I.6. Les activités biologiques

### I.6.1. Activités antibactériennes et antifongiques

Plusieurs travaux de recherche ont démontré des propriétés antibactériennes de *Majorana hortensis*. Les huiles essentielles (HE) dérivées des feuilles exercent une importante activité

antimicrobienne sur plusieurs types des bactéries : la *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus la coagulase*, *Enterobacter spp*, *Proteus spp*, *Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp S, aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Pseudomonas spp* (**Busatta et al., 2008, Freire, 2011**). De même les extraits éthanoliques et aqueux de *Majorana hortensis* possèdent aussi un effet inhibiteur très considérable sur des germes Gram positif et Gram négatif. L'extrait éthanolique a un effet d'inhibition élevé contre les bactéries comparables à l'extrait aqueux (**Mohamed, 2011**).

L'huile essentielle présente également une activité antifongique, notamment sur *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus* (**Freire, 2011, Sharma et al., 2011**). Par ailleurs, l'extrait éthanolique et hexanique exerce une activité inhibitrice sur six *Candida sp* (souches de levure) (**Kazlowska et al., (2010)**).

### **I.6.2. Activité anticonvulsivante**

Selon **Deshmane et ses collaborateurs (2007)**, un effet anticonvulsivant de *Majorana hortensis* a été étudié à l'aide du test Pentylentetrazole (PTZ) et d'électrochoc maximal (ECM). Les extraits d'éther de pétrole, de chloroforme, d'acétone, de méthanol et des extraits aqueux de *Majorana hortensis* ont montré un effet anticonvulsivant dans les modèles des crises induites par le PTZ et le MES chez les rats à des doses de 250 et 500 mg / kg. Les extraits de *Majorana hortensis* ont retardé l'apparition des crises.

### **I.6.3. Activité antidiabétique**

**Martha et Gutierrez (2012)**, ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles a une activité antidiabétique chez les souris induites par la streptozotocine par divers essais *in vitro* et *in vivo*.

### **I.6.4. Activité antimutagène**

L'extrait éthanolique des parties aériennes de la *Majorana hortensis* a montré un effet antimutagène chez les souris induites par le cyclophosphamide à la dose efficace minimale de 125 mg / kg. L'effet de l'extrait est trouvé pour protéger tout changement dans les teneurs en ARN, ADN et protéines dans le foie et les testicules des souris traitées par rapport au contrôle (**Naif, 2011**).

### **I.6.5. Activité antistress (anti-anxiété)**

D'après **Rezaie (2011)**, l'extrait des feuilles de la plante *Majorana hortensis* a montré un effet anti-anxiété sur les rats dans le modèle de labyrinthe ouvert à une dose de 200 mg / kg p.c. L'effet est dépendant et comparable au diazépam.

### **I.6.6. Effet antispasmodique**

L'huile essentielle de marjolaine est riche en terpinéol qui est obtenue par distillation de ses sommités fleuries et de ses feuilles. Elle est considérée comme un puissant antispasmodique stomachique, qui calme les spasmes et plus particulièrement ceux de l'estomac et du colon, son action laxative et digestive contribue au bien être digestif et intestinal (**Vagi, 2005**). Elle possède aussi des effets notables sur le système psycho-sensoriel. Elle est utilisée pour atténuer le rôle du système sympathique et pour favoriser l'action relaxante et reposante du système parasympathique (**Komaitis, 1992**).

### **I.6.7. Activité antitoxique**

*Majorana hortensis* est utilisée en applications locales sur les boutons pour inactiver le venin des insectes, inoculé par piqûre (**Vagi et al., 2005**).

## **II .Les radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants**

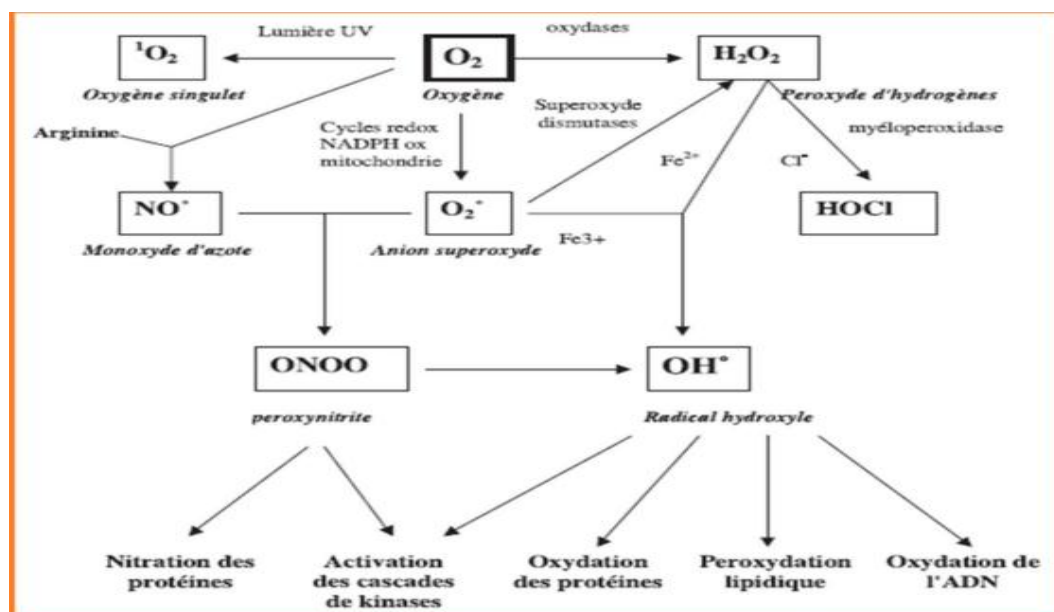
## II .Les radicaux libres, stress oxydatif et antioxydants

### II.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont connus dans la chimie depuis le début du 20ème siècle. Ils ont été initialement utilisés pour décrire des composés intermédiaires en chimie organique et inorganique (Rochette et al., 2013). Ce sont des molécules ou fragment de molécules très réactives, puisque ils contiennent des électrons non appariés dans leur orbite extérieure (Penna et al., 2009), ils cherchent donc à atteindre un état stable en s'appropriant les électrons des molécules proches qui à leur tour deviennent instables (Capasso, 2013). Aux doses faibles, les EOR sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles importants dans divers mécanismes physiologiques tel que la transduction du signal. Aux doses excessives, les EOR deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme (Mezziti, 2009).

#### II.1.2. Production des radicaux libres

La production des espèces oxydantes est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O<sub>2</sub> pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respiration oxydative. Cependant une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau au niveau de la mitochondrie, elle peut alors être à l'origine de la production de radicaux libres oxygénés (RLO) (Chu et al., 2010). Les autres sources de production de radicaux libres sont classées en deux catégories, les sources endogènes ou les RL sont des produits des réactions de l'organisme, et les sources exogènes tel que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactif chimiques, les solvants industriels et la pollution (figure 3) (Pastre, 2005).



**Figure 3 :** Origine de différentes espèces réactives de l'oxygène et de l'azote radicalaire et non radicalaires (Favier, 2003).

### **II.2. Le stress oxydant**

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et les pro-oxydants (**Meda et al., 2013**), que ce soit par un déficit dans les mécanismes de défense comprenant des composés et des enzymes antioxydantes (**Albayrak et al., 2013**) ou une surproduction des radicaux libres (**Duran et al., 2013**).

#### **II.2.1. Conséquences du stress oxydant**

Il s'agit des modifications des macromolécules cellulaires comme les lipides, les membranes, les protéines et les acides nucléiques. Ces altérations peuvent modifier les fonction des cellules et conduire à la mort cellulaire (**Ma et al., 2013**).

##### **II.2.1.1. L'action sur l'ADN**

L'ADN est constamment attaqué par des espèces réactives qui peuvent affecter sévèrement sa structure et sa fonction. Les modifications structurales de l'ADN résultent essentiellement à des modifications de ses bases, la coupure des brins d'ADN et l'altération de nombreuses protéines qui sont en contact avec l'ADN (**Jena, 2012**). Ces modifications peuvent conduire à des mutations génétiques affectant les oncogènes et les gènes suppresseurs des tumeurs (**Borrego et al., 2013**).

##### **II.2.1.2. L'action sur les protéines**

Les protéines sont facilement attaquées par les Espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERN) (**Xiang et al., 2013**), leur oxydation est définie comme une modification induite soit directement par les interactions avec les radicaux libres ou indirectement par la réaction avec des sous-produits secondaires du stress oxydatif. Les dommages protéiques causés par les radicaux libres impliquent plusieurs réactions chimiques comme l'oxydation des chaînes latérales d'acide aminé, fragmentation des chaînes de polypeptides et les changements de conformation des protéines. Ces modifications peuvent conduire à diverses conséquences fonctionnelles telles que l'inhibition des activités enzymatiques, une susceptibilité accrue à l'agglomération et la protéolyse, l'augmentation ou la diminution de l'absorption cellulaire (**Shacter, 2000, Kuka et al., 2012**).

##### **II.2.1.3. L'action sur les lipides**

Le stress oxydatif cause la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires quand les radicaux libres réagissent avec les constituants membranaire essentiellement les acides gras polyinsaturés et les LDL. Les interactions entre les ERO et les lipides se déroulent en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminassions (**Ahmed et al., 2013**). La peroxydation

des lipides implique la destruction des lipides membranaires, des troubles métaboliques et inflammatoires, la formation et la propagation des radicaux lipidiques avec de nombreux effets délétères (**Zhao et al., 2013**) comme le malondialdéhyde (MDA) qui est un produit caractéristique de ce processus (**Rofi et al., 2013**).

### II.2.1.4. L'action sur les carbohydrates

Les radicaux libres tels que OH• réagissent avec les carbohydrates par une abstraction d'un atome d'hydrogène d'un des atomes de carbone, pour produire un radical centré de carbone. Cela conduit à des ruptures dans la chaîne des molécules importantes comme l'acide hyaluronique dans le liquide synovial entourant les articulations (**Devasagayam et al., 2004**).

## II.3. Les antioxydants

Un antioxydant est défini comme toute substance ayant la capacité de retarder, prévenir ou inhiber la génération d'un oxydant toxique, d'arrêter ceux qui sont déjà produits et de les inactiver, bloquer de ce fait la réaction en chaînes de propagation produite par ces oxydants (**Tang and Halliwell., 2010**).

### II.3.1. Rôle des antioxydants

Les antioxydants peuvent protéger l'organisme contre les effets néfastes des espèces réactives comme suit (figure 4) :

- Inhibition de la formation des radicaux libres.
- Neutralisation des radicaux libres.
- Amélioration du système de défense du corps.
- Réparation des dommages résultants de radicaux libres en agissant spécifiquement par chélation des métaux de transition ou agir en synergie avec d'autres antioxydants pour se régénérer (**Lamina et al., 2013, Liochev, 2013, Valko et al., 2006**).

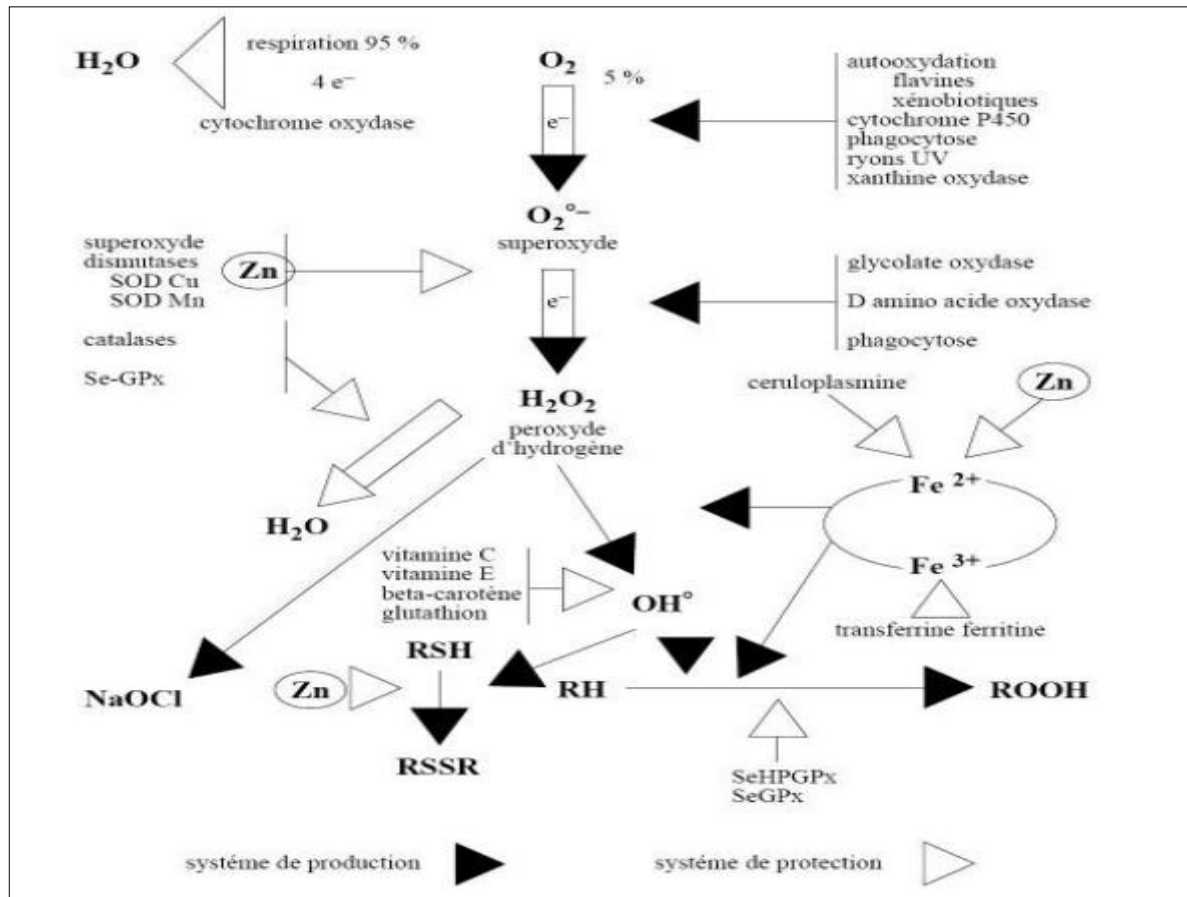


Figure 4 : Les systèmes de défense contre les radicaux libres (Dacosta, 2003).

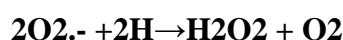
### II.3.2. Types d'antioxydants

Pour contrôler la production permanente des espèces réactives, les organismes vivants possèdent des systèmes de défense qui les protègent contre les dommages de ces radicaux. Les antioxydants peuvent être des enzymes ou de simples molécules. Certains sont produits par l'organisme, ce sont les antioxydants endogènes ou proviennent de l'alimentation ou la médication et sont donc exogènes (Rajesh et al., 2013).

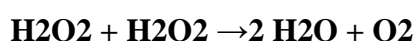
#### II.3.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Ce système comprend plusieurs éléments dont les plus connus sont : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathions peroxydase (GPx).

**a. La superoxyde dismutase (SOD)** Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en hydrogène peroxyde (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et en oxygène.



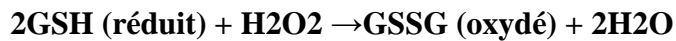
**b. La catalase** Cette enzyme est localisée essentiellement dans les peroxysomes (Valko et al., 2006). Elle permet de convertir deux molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>.





**c. La glutathion peroxydase** Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. Elle a pour activité la dégradation des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Valko *et al.*, 2006).

### GPX



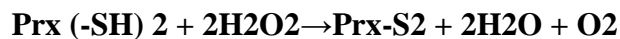
### GPX



A côté de ces enzymes principales, il se trouve :

### d. Les peroxyredoxines (Prxs)

Ce sont des enzymes dimériques avec une masse moléculaire d'environ 23 kDa. Ils sont caractérisés par la présence de résidus de cystéine à leur centre catalytique et agissent en tant qu'antioxydants spécifiques. Ces protéines sont également impliquées dans la dégradation enzymatique de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, d'hydroperoxyde et d'ONOO<sup>-</sup>.



La thioredoxine peut régénérer la forme réduite du Prx.



### e. Les paraxonases

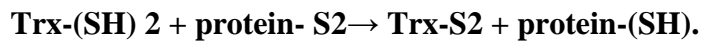
Récemment, la famille paraoxonase (PON) a émergé comme une nouvelle classe d'enzymes antioxydantes, jouant un rôle important dans les maladies associées à l'obésité, notamment les maladies cardiovasculaires et le diabète. Elle se trouve en particulier, à la surface des lipoprotéines de haute densité (HDL), PON1 protège les lipoprotéines de basse densité (LDL) et des cellules circulantes contre les dommages oxydatifs, évitant ainsi les réactions inflammatoires dans les cellules de la paroi artérielle (Savini *et al.*, 2013).

### f. L'hème oxygénase-1(HO-1)

L'HO-1 joue un rôle important dans le métabolisme de l'hème, elle est considérée comme une enzyme antioxydante capable de réduire le stress oxydatif et inhiber l'inflammation. Des résultats récents indiquent que HO-1 joue un rôle bénéfique dans les maladies cardiovasculaires et dans la régulation du poids corporel et le métabolisme dans le diabète et l'obésité (Savini *et al.*, 2013).

### g. Thioredoxin (Trx)

Cette enzyme avec un poids moléculaire de 12 kDa, est principalement trouvée dans le réticulum endoplasmique, sous la forme réduite. Elle contient deux groupes thiol (SH) qui peuvent être oxydés pour former le bisulfure (S<sub>2</sub> ou S-S)



Trx peut également réagir directement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



### II.3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Ce système comprend plusieurs molécules tels que le glutathion, l'acide urique et les protéines de stockage des métaux de transition (ferritine, transferrine, lactoferrine, céruloplasmine) (Savini et al., 2013). D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stable.

#### a. La vitamine E

C'est un terme qui désigne un ensemble de composés phénoliques appelés tocophérols)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\hat{U}$ ,  $\delta$ (ou tocols. Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. C'est l'  $\alpha$  tocophérol qui est biologiquement le plus efficace. Plus de 50% de la vitamine E se trouvent dans les tissus adipeux, le caractère hydrophobe de cette vitamine lui permet de s'insérer au sein des membranes biologiques riches en acides gras polyinsaturés, où elle joue un rôle protecteur efficace en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les espèces réactives (Papap, 2008, Yang and Clements, 2013).

#### b. La vitamine C

Elle est essentielle pour l'homme, car elle a plusieurs fonctions critiques comme un cofacteur enzymatique et un antioxydant (Kim et al., 2013), en tant que cofacteur enzymatique, la vitamine C est impliquée dans la synthèse des catécholamines, du collagène, la synthèse de carnitine, la transformation de la dopamine en noradrénaline, le métabolisme des stéroïdes, de la tyrosine, du cholestérol et la formation de l'acide biliaire. Comme antioxydant, la vitamine C protège l'ADN, les protéines, les lipides, les enzymes et d'autres antioxydants par le piégeage des radicaux libres et la réduction des ions métalliques (Ge et al., 2008, Pallauf et al., 2013).

#### c. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH• et peroxydes RO. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique. Les caroténoïdes peuvent aussi capter l'oxygène singulet, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets (Gardés et al., 2003). Le

$\beta$ -carotène (provitamin A), le composant le plus efficace dans la famille des caroténoïdes ; est une substance liposoluble susceptible d'être transformé en vitamine A dans le corps (**Sanders and Emery, 2003**).

### **d. Les polyphénols**

Les polyphénols sont connus par leur activité antioxydante (**Zhu et al., 2012**) qui est due à la présence d'un nombre important de groupements hydroxyles phénoliques (**Hannan et al., 2012**). Les propriétés redox de ces composés leur permettent d'agir en tant qu'agents réducteurs, donateurs d'hydrogène et éliminateurs de l'oxygène singulet. Certains montrent des propriétés chélatrices de métaux (**Proestos et al., 2013**) et d'autres peuvent empêcher la production enzymatique des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'inhibition de cyclooxygénase, lipoxygénase et cytochrome P450 (**Ferguson, 2001**), de même, augmenter l'expression des enzymes qui ont une activité antioxydante telles que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase (**Jayasena et al., 2013**).

# **Partie expérimentale**

# **III. Matériel et méthodes**

### III. Matériel et méthodes

#### III.1. Matériel végétal

La plante a été achetée au mois de février 2019 chez un herboriste à la wilaya de Bordj Bou Arreridj. Le matériel végétal est constitué par les feuilles de la *Majorana hortensis* de deux variétés une égyptienne et l'autre pakistanaise (figure 5). Sur le plan morphologique aucune différence visuelle, n'est apparente entre les deux variétés.

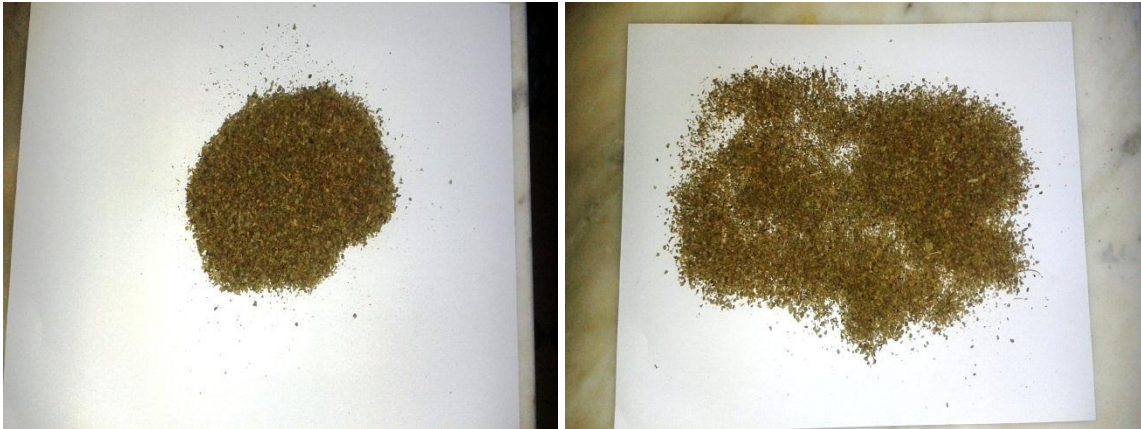


Figure 5 : la plante *Majorana hortensis* sèche.

#### III.2. Méthodes

##### III.2.1. Broyage et tamisage

Les feuilles séchées ont été préalablement broyées à l'aide d'un broyeur électrique après on fait leur tamisage pour obtenir une poudre fine de couleur grise verte (figure 6). La poudre obtenue est conservée dans une boîte en verre couverte avec du papier aluminium, afin de préserver l'obscurité en conservant au maximum les métabolites contre les effets de l'oxydation par les photons.



Figure 6 : la plante *Majorana hortensis* après leur broyage.

### III.2.2. Préparation des extraits

25 g de poudre végétale sont mis à macérer pendant 24 heures dans 125 ml d'une solution méthanolique sous agitation continue pour les deux variétés Egyptienne et Pakistanaise. L'extrait est ensuite filtré puis évaporé à sec sous pression réduite à 45°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ces extraits vont être utilisés après pour réaliser le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et ainsi évaluer la capacité antioxydante.

### III.2.3. Screening phytochimique

Le screening phytochimique représente l'ensemble des techniques qualitatives permettant la détermination des différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais les principaux sont les polyphénols totaux y compris les flavonoïdes, les anthocyanes, les tannins, les coumarines, les alcaloïdes, les saponosides, les stéroïdes, les stérols, les terpènes...etc (**Lendvai et al., 2002**). Le screening est réalisé soit sur la poudre végétale, soit sur l'infusé.

#### III.2.3.1. Les tanins

Nous avons introduit dans un tube à essai 2ml d'infusé à 5 % ; puis nous avons ajouté quelques gouttes de solution FeCl<sub>3</sub> à (5 % dans l'éthanol). En présence de tanins, il se développe une coloration brune verte qui révèle la présence des tanins (**Trease and Evans., 1987**).

#### III.2.3.2. Les alcaloïdes

Nous avons introduit de la poudre végétale (10 g) dans un erlenmeyer de 250 ml à laquelle nous avons ajouté 50 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué au 1/10 (50 ml). Ce mélange a été agité et macéré pendant 24 heures à température ambiante du laboratoire. Nous avons filtré sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 25 ml de filtrat. Le volume est traité par le réactif de Wagner. La formation d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes (**Paris and Moyse., 1969**).

#### III.2.3.3. Les anthocyanes

2ml d'infusion sont ajoutés à 2ml d'acide chlorhydrique 2N. L'apparition d'une coloration rose qui vire au bleu violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Paris and Moyse., 1969, Debry et al., 1971**).

#### III.2.3.4. Les coumarines

1g de poudre végétale est placé dans un tube, en présence de quelques gouttes d'eau. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué (10 %), et sont portés à

l'ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous UV (**Rizk, 1982**).

### III.2.3.5. Les stérols et triterpènes

Le test se fait sur une macération de 24h à 5% d'éther, l'extrait est ensuite évaporé à sec et repris avec 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides (**Trease and Evans., 1987**).

### III.2.3.6. Les saponosides

Dans un tube à essai, 2g de poudre de plante sont mélangés avec 80 ml d'eau distillée puis ports à l'ébullition pendant 5 min, on filtre l'extrait et ensuite refroidit et agité vigoureusement pendant 2 min, la formation d'une masse plus au moins importante indique la présence des saponosides (**Trease and Evans., 1987**).

## III.2.4. Analyse quantitative des extraits méthanoliques

### III.2.4.1. Dosage des composés phénoliques

#### ➤ Principe

La teneur en composés phénoliques des différents extraits des feuilles de *Majorana hortensis* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (**Li et al., 2007**) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphomolybdique (MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (**Georgé et al., 2005**).

#### ➤ Mode opératoire

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20-160 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait. (**Li et al., 2007**).



### III.2.4.2. Dosage des flavonoïdes

#### ➤ Principe

Le teste des flavonoïdes est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Majorana hortensis*. Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium  $AlCl_3$  avec lequel ils forment des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols. Par ailleurs,  $AlCl_3$  peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes (**Chang et al., 2002**).

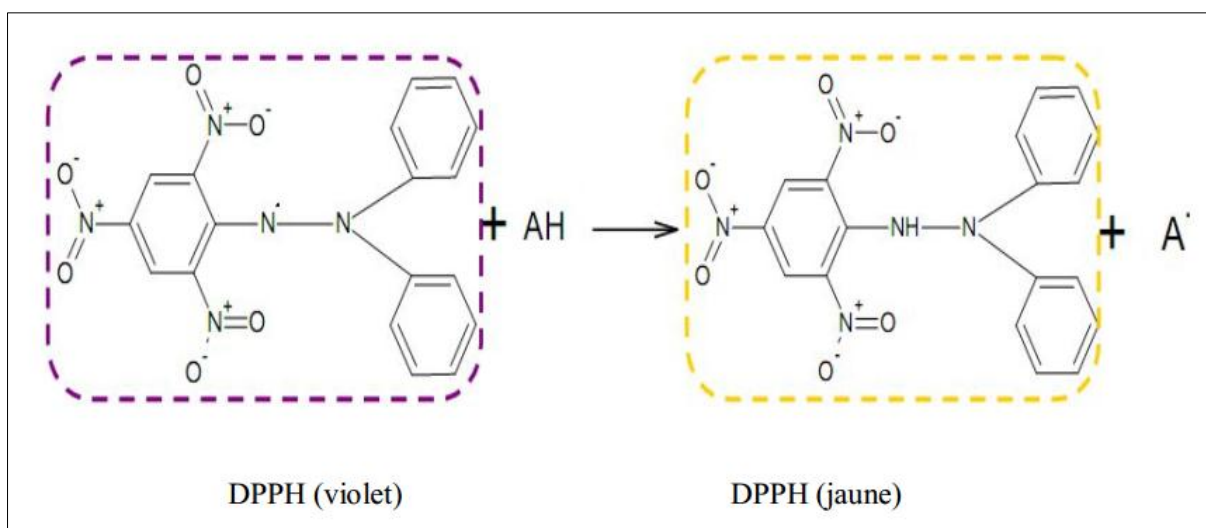
#### ➤ Mode opératoire

La méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorun et al., 1996**) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits de *Majorana hortensis*. À 1 ml d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-40  $\mu\text{g/ml}$ ) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

### III.2.5. Evaluation in vitro de l'activité antiradicalaire

#### ➤ Principe

La molécule de 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH $\cdot$ ) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH $\cdot$  est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite (figure 7). Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517 nm (**Brand, 1995**).



**Figure 7 :** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Brand, 1995).

### ➤ Mode opératoire

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphénylpicryl-hydrayl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par (Mansouri *et al.*, 2005). Dans ce test les antioxydants réduisent le diphénylpicryl-hydrayl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphénylpicryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez, 2002). Brièvement, La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25  $\mu$ L des solutions d'extraits ou standard (l'acide ascorbique) sont ajoutés à 975  $\mu$ L DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm. Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 0,006mg/ml. Alors que celles de l'acide ascorbique sont comprises entre 0 à 6  $\mu$ g/ml. Le pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH a été calculé comme suite :

$$I\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs control}} \times 100$$

### III.2.6. Traitement statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne  $\pm$ SD. Les valeurs d'IC50 sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe d'étalonnage en utilisant le logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée à partir le test ANOVA univariée suivie pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les valeurs de  $p \leq 0.05$  sont considérées significatives.

## **IV. Résultats et discussion**

### IV. Résultats et discussion

#### IV.1. Le rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait brut et celle de la plante sèche en poudre (figure 8). Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

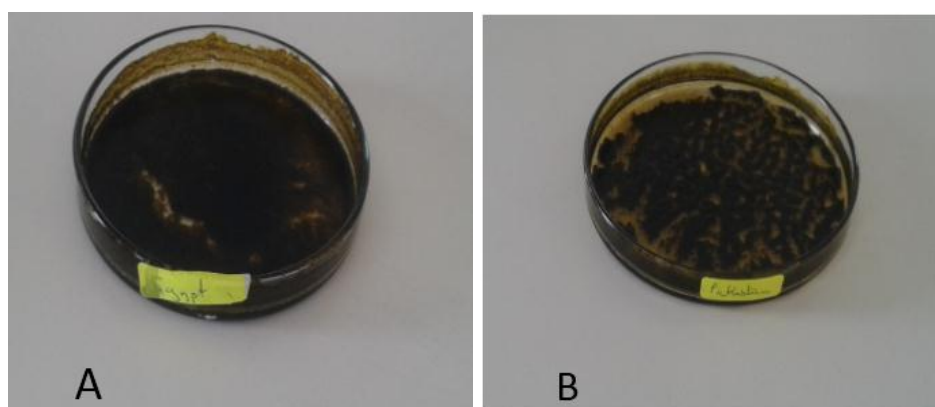
**PB** : poids d'extrait brut.

**PA** : poids de la plante sèche en poudre.

Les résultats sont cités au **tableau 3**.

**Tableau III** : les rendements des extraits de *Majorana hortensis*

Extrait	Le rendement (%)
L'Extrait Egyptien	7,08
L'extrait Pakistanais	8,34



**Figure 8** : Les extraits bruts de *Majorana hortensis*. A : extrait Egyptien, B : extrait Pakistanais

Le rendement de la plante d'origine Egyptienne est de **7,08 %** à partir de 100g de poudre sèche. D'autre part la même quantité de la plante d'origine Pakistanaise donne un rendement de **8,34%**. La variété pakistanaise a un rendement plus important que celle de la variété Egyptienne. La distinction entre les deux échantillons est remarquable de **1,26%**. On suppose que cette variance est en raison de la nature du sol et des facteurs climatiques qui sont différents d'une région à l'autre.

Dans une étude réalisée par **Benchikha et ses collaborateurs (2013)** sur les extraits méthanoliques de deux espèces de *Majorana hortensis*, *Origanum vulgare*, ils ont trouvé que le rendement le plus élevé est de *Majorana hortensis* de  $8,16 \pm 0,108$ . C'est un pourcentage similaire à celui obtenu dans notre cas. Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats

avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées (Mezziti, 2009).

### IV.2. Screening phytochimique

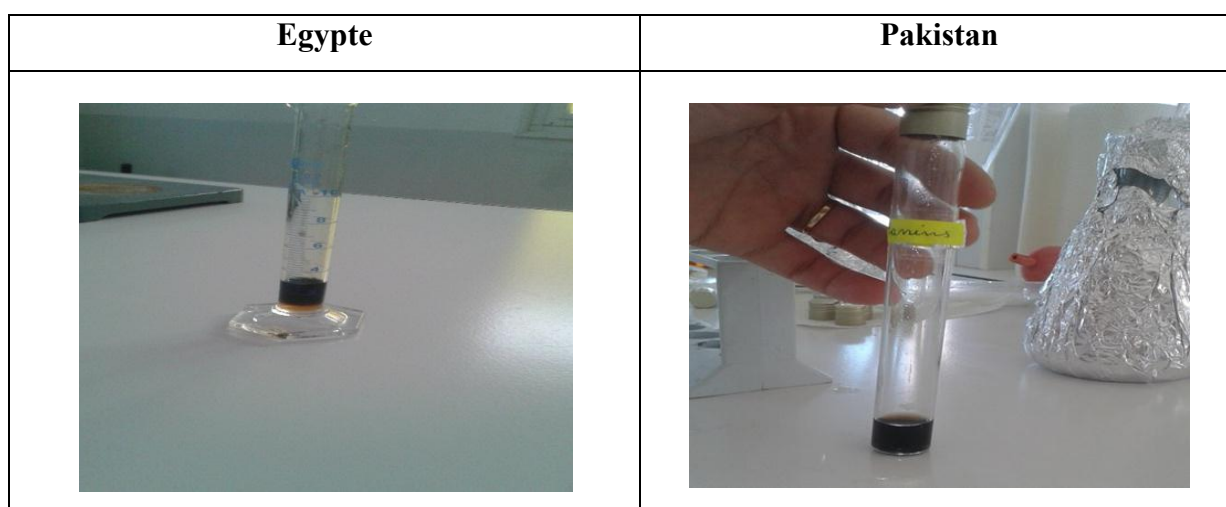
Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des feuilles des deux variétés de *M. hortensis*.

#### IV.2.1. Les tanins

L'apparition de la couleur brune verte (figure 9) dans les deux tubes pour les deux extraits Egyptien et Pakistanais a permis de mettre en évidence la présence des tanins au niveau des deux variétés (tableau 4).

**Tableau IV** : Détection des tanins

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les tanins	FeCl <sub>3</sub>	++	+++



**Figure 9** : Détection des tanins.

Les tanins appartiennent au groupe des polyphénols qui sont des métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes (Mueller, 2006).

Pimple et ses collaborateurs (2012), ont montré la présence des tanins dans l'extrait méthanoïque, ce qui est en accord avec notre résultat, mais leur absence dans l'extrait éthanoïque. Cependant Prerne et son équipe (2015) montrent la présence des tanins dans extrait éthanoïque.

### IV.2.2. Les alcaloïdes

On observe un précipité brune (figure 10) dans les deux tubes ce qui signifie la présence des alcaloïdes avec une quantité plus élevée chez la variété Egyptienne que la variété Pakistanaise (tableau 5).

Tableau V : Détection des alcaloïdes

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les alcaloïdes	Wagner	++	+

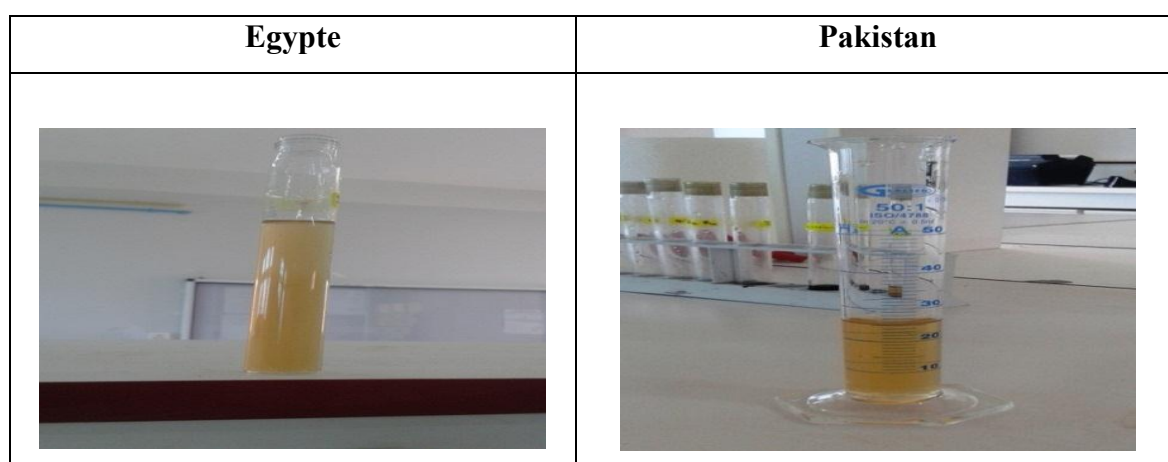


Figure 10 : Détection des alcaloïdes.

**Bimala et son équipe (2016)** dans leur travail ont montré la présence des alcaloïdes dans les extraits méthanoïque et aqueux de la marjolaine. Ce qui est en accord avec notre résultat pour le premier extrait. Cependant les travaux de **Pimple et ses collaborateurs (2012)**, ont montré l'absence des alcaloïdes dans tous les extraits : méthanoïque, aqueux et d'éther de pétrole.

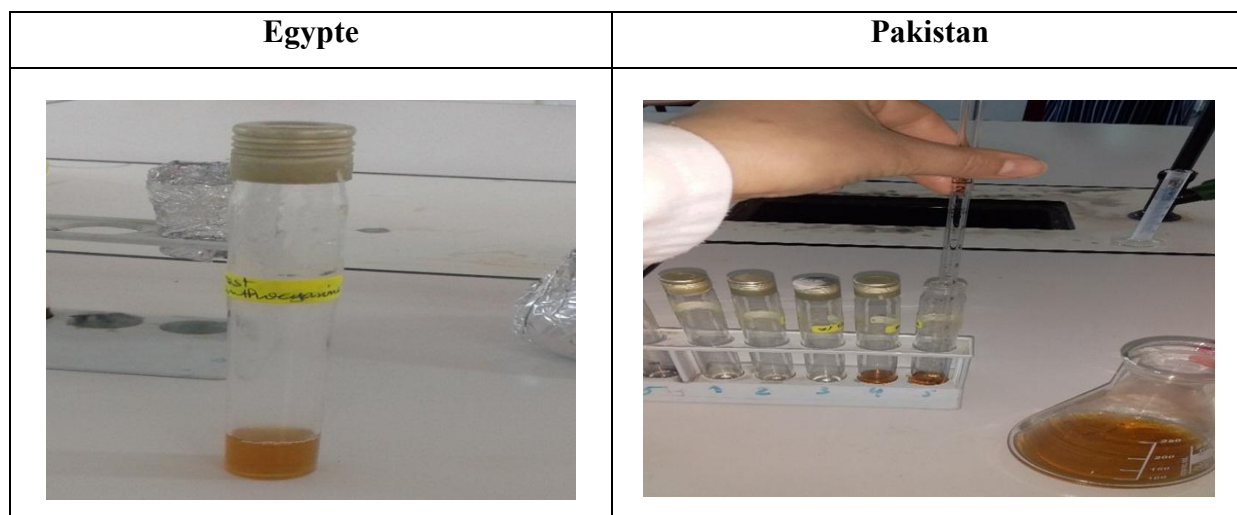
La présence des alcaloïdes expliquent l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle et la diversité de leurs activités biologiques.

### IV.2. 3. Les anthocyanes

Nous n'avons pas remarqué aucune coloration ni le rose ni le bleu violacé (figure 11) ce qui indique l'absence des anthocyanes chez les deux variétés (tableau 6)

**Tableau VI :** Détection des anthocyanes

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les anthocyanes	Acide chlorhydrique	---	---



**Figure 11 :** Détection des anthocyanes.

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques d'une autre espèce de la même famille l'*O. vulgare* par **Bendifallah et ses collaborateurs (2015)**, ont démontré la présence des anthocyanes.

#### IV. 2.4. Les coumarines

Nous n'avons observé aucune fluorescence jaune (**tableau 7**) chez les deux variétés ce qui montre l'absence des coumarines (figure 12).

**Tableau VII:** Détection des coumarines

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les coumarines	Na OH	-	-

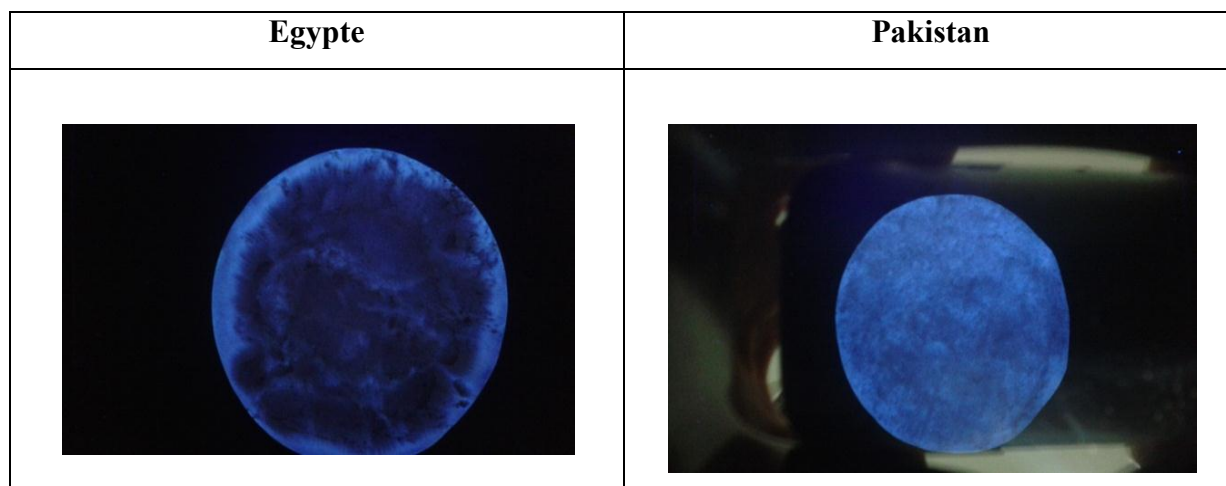


Figure 12 : Détection des coumarines.

### IV 2. 5. Les stérols

On remarque l'apparition d'un anneau rouge-brunâtre (figure 13) entre les deux liquides chez les deux variétés ce qui indique la présence des stérols (tableau 8).

Tableau VIII : Détection des stérols

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les stérols	Anhydride acétique	++	++

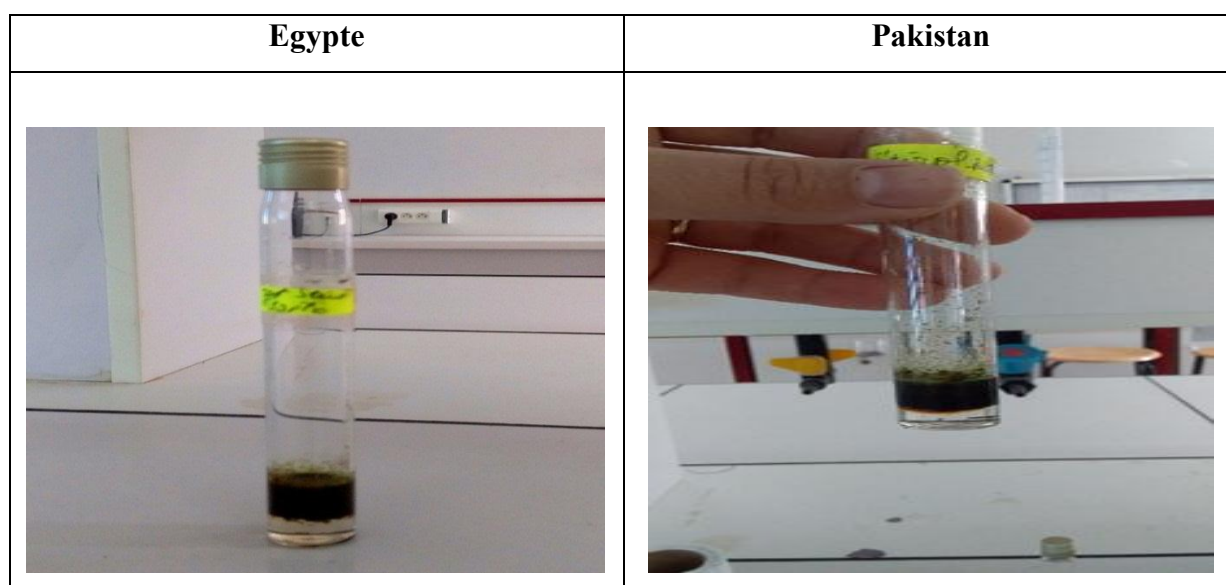


Figure 13 : Détection des stérols.



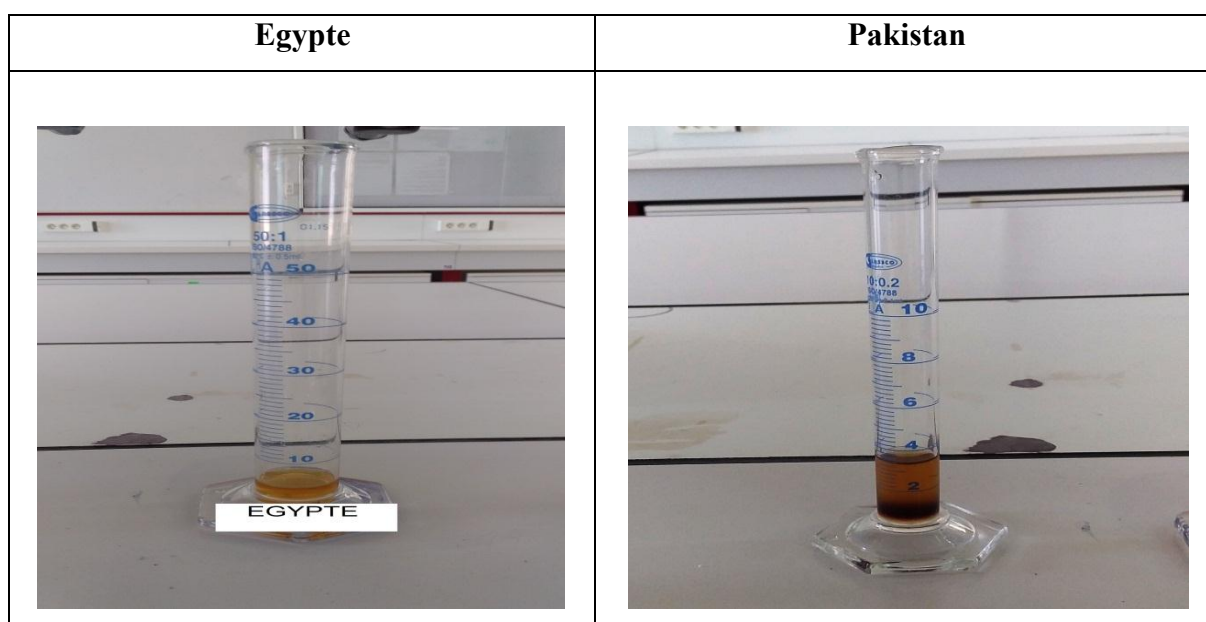
**Bimala et son équipe (2016)** ont montré la présence des stérols dans l'extrait d'éther de pétrole avec une quantité plus importante que celle dans l'extrait méthanoïque. Cependant **Pimple et ses collaborateurs (2012)**, ont montré leur absence dans l'extrait méthanoïque.

### IV.2.6. Les triterpènes

On n'observe aucune coloration dans l'extrait Egyptien, par contre on remarque une coloration bleu-verte dans l'extrait Pakistanais (figure14) ce qui indique la présence des triterpènes (**tableau 9**).

**Tableau IX :** Détection des triterpènes

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les triterpènes	Anhydride acétique et H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	++



**Figure 14 :** Détection des triterpènes.

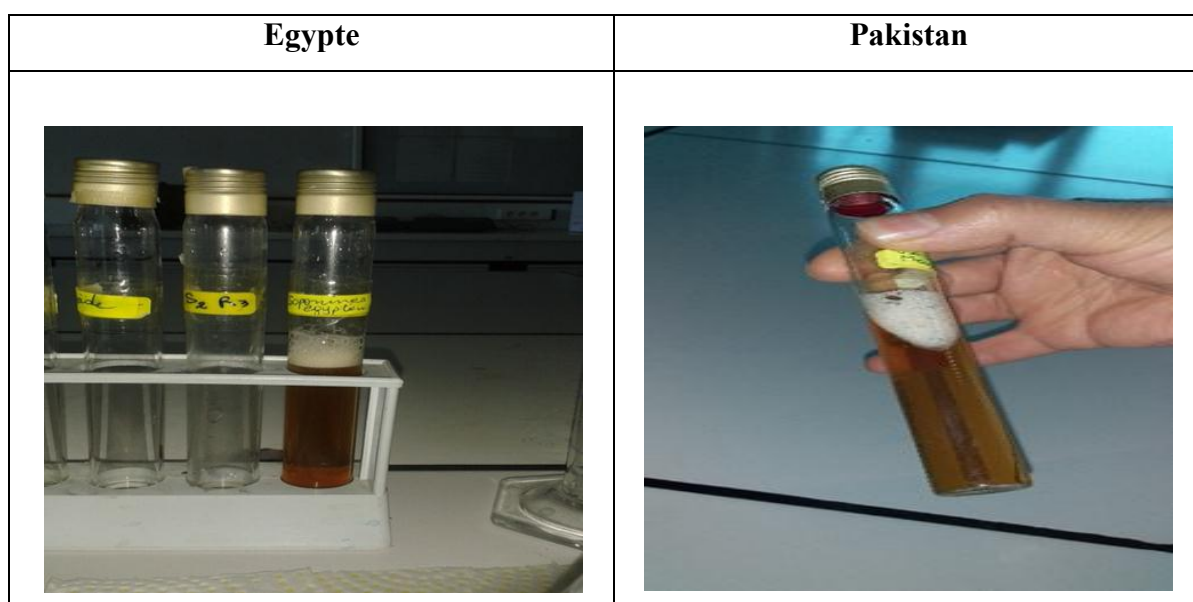
**Regiset son équipe (2018)**, prouvent aussi l'existence des terpènes dans plusieurs extraits y compris l'extrait méthanoïque de *Majorana hortensis*.

### IV.2.7. Les saponosides

On observe dans les deux extraits la formation d'une mousse d'environ 1cm chez la variété Egyptienne et d'environ 0,5 cm chez la variété Pakistanaise (figure 15) ce qui indique la présence des saponines dans notre plante (**tableau 10**).

**Tableau X:** Détection des saponosides

Classe de composé recherché	Réactif	Origine de la plante <i>M. hortensis</i>	
		Egypte	Pakistan
Les saponosides	//	+++ (1 cm)	++ (0,5cm)



**Figure 15 :** Détection des saponosides.

Les travaux de **Regis et al (2018)** et **Pimple et son équipe (2012)**, ont montré la présence des saponines dans les extraits méthanoïque de la marjolaine. Ce résultat est en concordance avec celui réalisé sur notre plante.

Les tests phytochimiques effectués sur les deux extraits préparés par macération ont révélé la richesse de cette plante en alcaloïdes, tanins, terpénoides, saponosides et stérols. Cette abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques.

### IV.3. Analyse quantitative des extraits méthanoliques

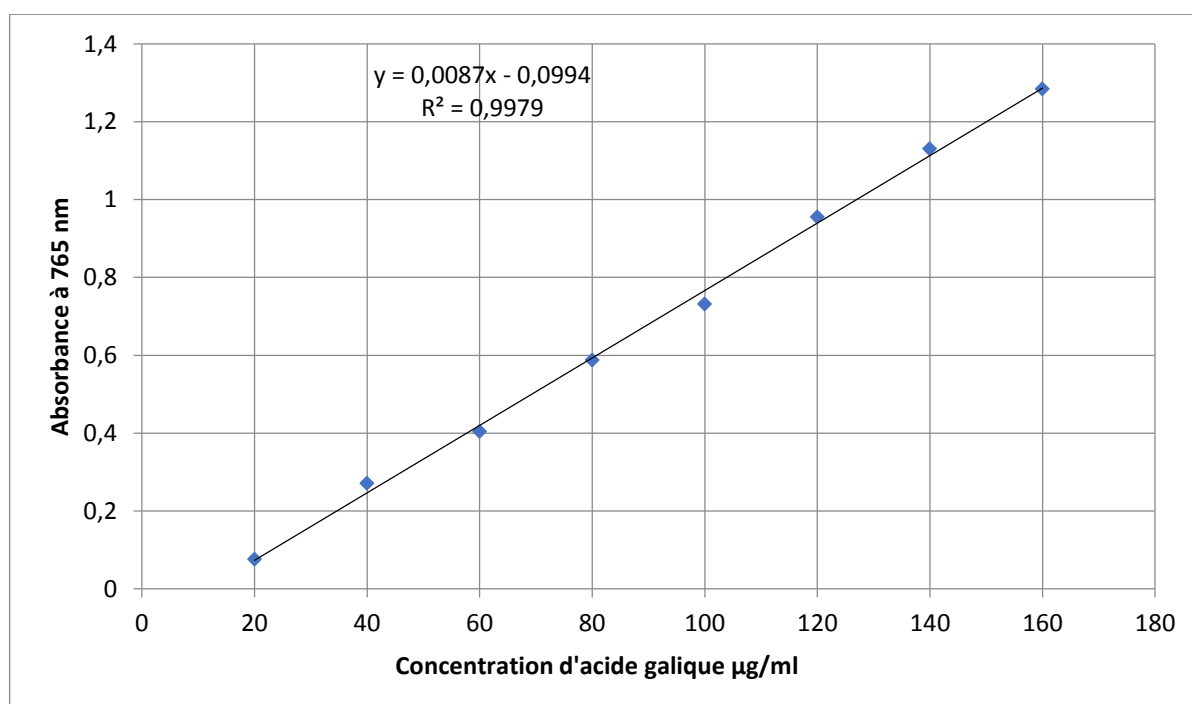
#### IV.3.1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué afin de caractériser la teneur des extraits préparés à partir des feuilles de la Sauge officinale.

Le contenu en polyphénols totaux a été déterminé par la méthode du Folin Ciocalteu (**Li et al.,2007**). L'acide gallique a été utilisé comme standard.

La méthode du Folin Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour plusieurs raisons : C'est une méthode qui satisfait aux critères de fiabilité et de reproductibilité, la disponibilité de réactif de folin et la méthode est bien standardisée (**Huang et al., 2005**).

Les teneurs obtenues sont exprimées en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par mg de l'extrait ( $\mu\text{g}$  EAG/mgE) à (765nm), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique. Les résultats sont représentés dans le **tableau 11** et dans la figure 16.



**Figure16** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

**Tableau XI** : Dosage des polyphénols totaux dans les extraits de *Majorana hortensis*

Extrait	Polyphénols totaux ( $\mu\text{g}$ .EAG/mg)
Egypte	<b>51,54 <math>\pm</math> 0,64</b>
Pakistan	<b>54,76 <math>\pm</math> 0,398</b>

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type d'échantillons en triples.

Les valeurs du dosage des polyphénols totaux révèlent que les extraits méthanoïques de l'espèce *Majorana hortensis* contiennent les teneurs suivantes : **51,54  $\pm$  0,64  $\mu\text{g EAG/mg}$**  pour l'extrait Egyptien et de **54,76 $\pm$ 0,398  $\mu\text{g EAG/mg}$**  pour l'extrait Pakistanais. Ces valeurs sont importantes où la concentration chez la variété Pakistanaise est plus important que celle de l'Égyptienne. Cette variance peut être en raison des plusieurs facteurs notamment la présence dans les cellules végétales de différents types d'enzymes, susceptibles de modifier les composés phénoliques, en particulier les polyphénols oxydases et les glycosidases. Le séchage du végétal est une bonne méthode pour éliminer les activités enzymatiques mais, la température de séchage peut être un facteur destructeur des polyphénols (**Ribéreau, 1982**).

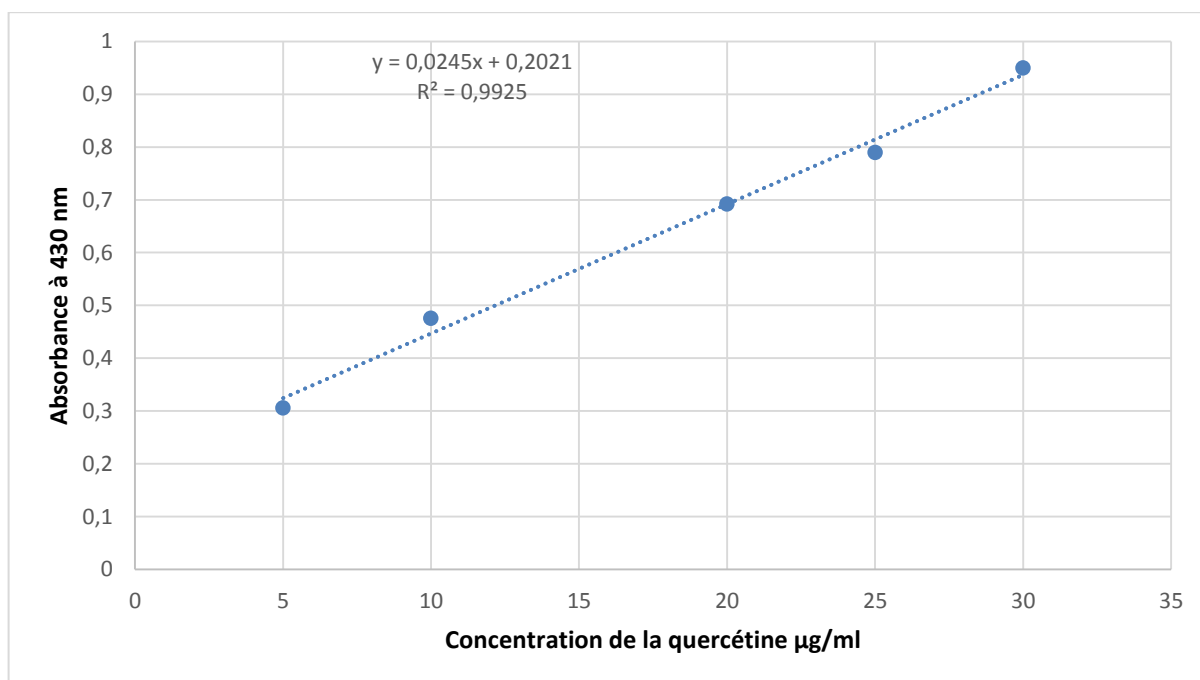
Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies (**Ebrahimi et al., 2008**), ainsi, le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante (**Miliauskas et al., 2004**). Notons Aussi, la méthode d'extraction et de quantification qui peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux (**Lee et al., 2003**).

Dans une étude sur deux espèces *Majorana hortensis* et *Origanum vulgare* réalisée par **Benchikha et ses collaborateurs (2013)**, ils ont observé qu'une teneur significative en composés phénoliques a été observée pour l'extrait méthanolique de *Majorana hortensis* (**266,86  $\mu\text{g EAG/mg}$** ) comparable avec l'extrait méthanolique d'*Origanum vulgare* (**194,78  $\mu\text{g EAG/mg}$** ). Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux enregistrés dans notre étude.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium (**Bahorum et al., 1996**) en utilisant la quercétine comme standard. Les résultats pour les différents extraits sont exprimés en ( $\mu\text{g EQ/mgE}$ ), utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de la quercétine (430nm).

Les résultats sont représentés dans le **tableau 12** et la gamme d'étalonnage dans la figure 17.



**Figure 17 :** Courbe d'étalonnage de la quercétine.

**Tableau XII:** Dosage des flavonoïdes totaux dans les extraits de *Majorana hortensis*

Extrait	Flavonoïdes totaux (µg.EQ/mg)
Egypte	<b>36,96 ± 1,7</b>
Pakistan	<b>27,36 ± 0,49</b>

On note que la teneur en flavonoïdes totaux est de **36,96±1,7µg.EQ/mg** pour l'extrait Égyptien est supérieur à celle de l'extrait Pakistanais qui est de **27,36±0,49µg.EQ/mg**.

Dans une étude sur cette même espèce avec d'autre du même genre (*Origanum vulgare*) réalisée par **Benchikha et ses collaborateurs (2013)**, les valeurs moyennes de la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait éthanolique variait de **36,63 à 57,55µg.EQ/mg**, les teneurs en flavonoïdes les plus élevées se trouvant dans *Majorana hortensis* de **57,55 µg.EQ/mg**. Ce résultat est nettement supérieur à celui enregistré dans notre étude.

Il a été prouvé que les teneurs des phénols totaux et des flavonoïdes sont élevées lorsque le milieu de vie de la plante n'est pas adéquat, dans ce cas la plante favorise la synthèse des métabolites secondaires afin de s'adapter et survivre (**Tim Andrew, 2005, Piquemal, 2008**).

La teneur élevée en composés phénoliques par comparaison aux flavonoïdes est logique étant donné que les flavonoïdes représentent les composés majoritaires des polyphénols (**Boussahel, 2009**). Ceci peut être aussi expliqué par une augmentation du métabolisme phénolique de la plante ; en plus, l'existence d'une liaison avec les conditions climatiques défavorables et les conditions de collections telles que les températures élevées, la durée

d'exposition solaire, la nature du sol et la saison de croissance (Djeridane *et al.*, 2006, Fecka and Turek, 2007, Dent *et al.*, 2017).

### IV.4. Activité piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydante des différents extraits de *Majorana hortensis* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

#### ➤ Calcul des pourcentages d'inhibition

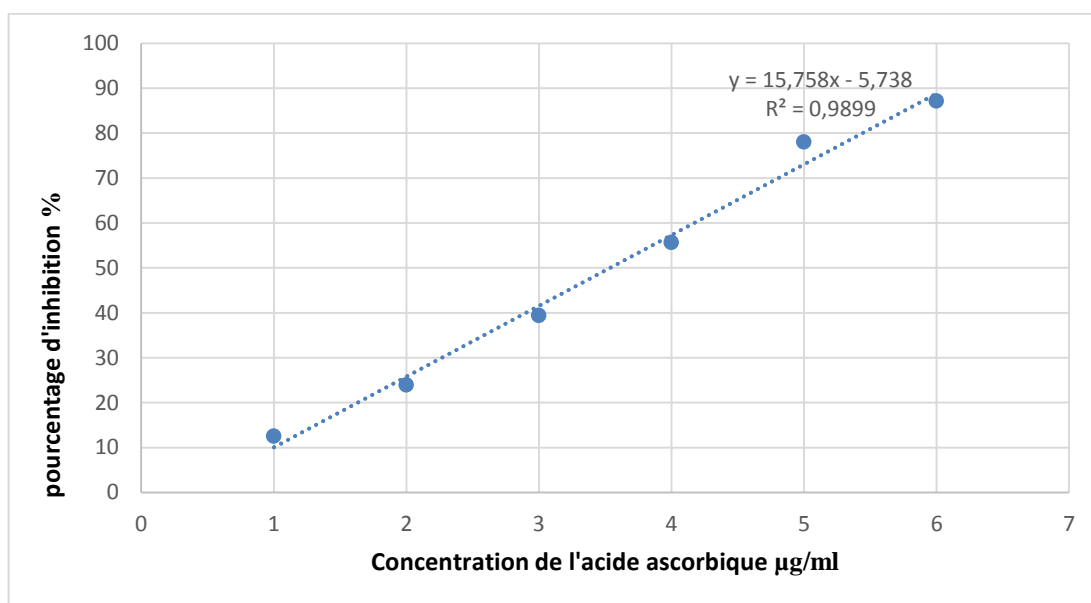
On a calculé ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante.

$$I\% = [(Abs_{517} \text{ contrôle} - Abs \text{ échantillon}_{517}) / Abs_{517} \text{ contrôle}] \times 100$$

#### ➤ Détermination d'IC50

IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante de composé est grande. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Nous avons remarqué que l'absorbance du mélange diminue vers une valeur plus basse, ainsi la solution change de couleur instantanément du violet au jaune.

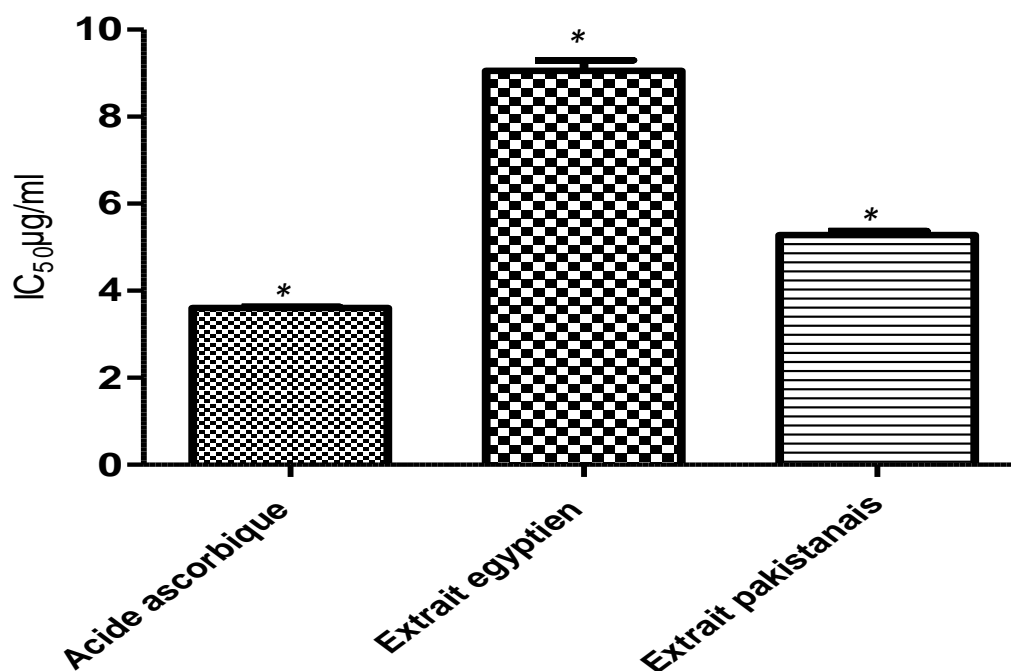
La comparaison et la validation des résultats sont effectués avec un contrôle positif utilisant l'acide ascorbique (figure 18). L'ensemble des résultats sont cités au **tableau 13** et la figure 19.



**Figure 18** : Gamme d'étalonnage de l'acide ascorbique.

**Tableau XIII :** Test de réduction du radical DPPH° par les extraits méthanoliques et l'acide ascorbique.

Échantillons (µg/ml)	IC50 (µg /ml)
Extrait (Egypte)	9,05 ± 0,416
Extrait (Pakistan)	5,284 ± 0,149
Acide ascorbique	3,605 ± 0,04



\* significative

**Figure 19 :** Capacité d'inhibition du radical DPPH (IC50) par les extraits méthanoliques et l'acide ascorbique.

A travers les résultats obtenus (figure 19), on a déduit, d'une part qu'il y a une différence significative entre la capacité anti oxydante de l'extrait méthanolique Egyptien (**9,05 ± 0,416 µg /ml**) et celle Pakistanais (**5,284 ± 0,149 µg /ml**), où la capacité anti radicalaire la plus grande est observée chez la variété pakistanaise. D'une autre part ces extraits ont présenté une différence significative en comparaison avec le standard (acide ascorbique) qui présente une

capacité antioxydante (**3,605 ±0,04 µg /ml**) supérieure à celle des extraits des deux variétés étudiées. Ces résultats ont révélé une importante activité anti-radicalaire des extraits envers le DPPH.

D'après l'étude réalisée par **Regis et ses collaborateurs (2018)**, l'extrait hydroéthanolique de *Majorona hortensis* a montré une activité antioxydante en piégeant le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec une valeur d'IC50 de **37.42µg /ml**. Ce résultat est nettement supérieur à celui enregistré dans notre étude.

A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de la corrélation entre le polyphénol et l'activité antioxydante. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols (**Athamena et al., 2010**), et ceci confirme nos résultats où nous avons trouvé que l'extrait Pakistanais contient une quantité des composés phénolique et une activité anti-radicalaire plus grande que l'extrait Egyptien.

Les polyphénols sont caractérisés par un nombre élevé des groupements hydroxyles qui présentent l'activité antioxydante la plus élevée, due à leur pouvoir de donner plus d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (**Heim et al., 2002**)



# **Conclusion et perspectives**

### Conclusion

L'intérêt accordé à l'étude scientifique du pouvoir thérapeutique des plantes médicinales n'a cessé d'augmenter durant ces dernières années afin de rechercher de nouvelles alternatives aux drogues chimiques, qui sont sans effets néfastes pour la santé humaine et de l'environnement.

*Majorana hortensis* est une plante annuelle de la famille des lamiacées, elle contient des molécules importantes qui peuvent être employé pour des applications thérapeutiques.

Le screening phytochimique de cette plante a montré la présence des tanins, les alcaloïdes, les stérols et les saponosides chez les deux variétés et l'absence des coumarines et des anthocyanes, ainsi que la présence des triterpènes chez la variété Pakistanaise et leur absence chez l'autre variété Egyptienne. L'évaluation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-ciocalteu a révélé la présence de la quantité la plus élevée de ces métabolites dans la variété Pakistanaise par rapport celle Egyptienne. Cependant les flavonoïdes sont plus fréquents dans la variété Egyptienne.

Les différents extraits testés ont manifesté une activité antioxydante mesurée *in vitro* par le test du DPPH. Nous avons constaté que *Majorana hortensis* d'origine Pakistanais est douée d'un pouvoir antioxydant très important que celle d'origine Egyptien.

En fin, l'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une petite partie de la recherche des substances et sources naturelles biologiquement actives, nous envisageons comme perspective d'utiliser des méthodes modernes pour l'extraction des principes actifs, et de valoriser leur présence par des techniques précises et sensible comme la chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CPG-SM), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la chromatographie liquide haute performance (l'HPLC). Aussi de confirmer l'activité antioxydante par des études *in vivo*.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques

1. **Abdalla E., Imane M. T. & Laila K. B. (2012).** Physiological effect of some antioxidant polyphenols on sweet marjoram (*Majorana hortensis*) plants. *Bioscience* **4(1)**, 11-15.
2. **Ahmed M., Khan M. I., Khan M. R., Muhammad N., Khan A. U. & Ali Khan R. (2013).** Role of medicinal plants in oxidative stress and cancer. *Scientific Report* **2(2)**, 1-3.
3. **Albayrak S., Aksoy A. & Sagdic O. (2013).** In vitro antioxidant and antimicrobial activity of some Lamiaceae species. *Iranian Journal of Science & Technology* **1**, 1-9.
4. **Athamna S., Chalghem L., KassahLaouar A. & Khrbri E. S. (2010).** Ativitéantioxydante et antimicrobienne d'extrait de *Cuminum cuminu L.* *Lebanese science journal* **11(1)**, 69-91.
5. **Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M. & Gazin M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* **46**, 1086-1089.
6. **Benchikha N. & Menaceu Barhi Z. (2013).** Extraction and antioxydantes activities of two species *Origanum* plant containing phenolic and flavonoid compounds. *Journal and applied sciences* **5(1)**, 120-128.
7. **Bendifallah L., Tchoulak Y., Djouabi M., Oukili M. & Ghezraoui R. (2015).** Phytochemical study and antimicrobial activity of *Origanum vulgare L.* (Lamiaceae) in Boumerdes mountainous region (Algeria). *J. Med. Bioeng* **4(6)**, 471-474.
8. **BimalaTripathy S., Satyanarayana K., Abedulla Khan., Raja K. & Chandan Mohanty. (2016).** Phytochemical Screening and Antifungal Activity of Ethanol and Petroleum-Ether Leaf Extracts of *Origanum Majorana*. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences* **4 (4)**, 1320-1323.
9. **Borrego S., Vazquez A., Dasí F., Cerdá C., Iradi A., Tormos C., Sánchez J. M., Bagán L., Boix j., Zaragoza C., Camps J. & Sáez G. (2013).** Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-oxo-7'8- dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dg) as a possible tumor marker. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 3467-3486.
10. **Boussahel R., Irinislimane H., Harik D. & Moussaoui K. M. (2009).** Adsorption, kinetic and equilibrium studies on removal of p,p'-DDT from aqueous solutions using low-cost adsorbents. *Chemical Engineering Communications* **196**, 1556-1567.
11. **Brand-Williams W., Cuvelier M. E & Berset C. (1995).** Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* **28**, 25-30.
12. **Bremness L. (1994).** The Compleat Book of Herbs, A Practical Guide to Growing and Using Herbs, Studio, Seattle Goodwill, WA, USA **5**.
13. **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Tec & Doc. Paris **(3)**, 101-120.
14. **Bruneton J. (2009).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, Tec & Doc. Paris **(4)**, 128.
15. **Busatta C., Vidal R. S, Popiolski A. P., Dariva C., Rodrigues M. R. A., Corazza F. C., Corazza M. L., Oleveira J. V. & Cansian R. L. (2008).** Application of *Origanum majorana L.* essential oil as an antimicrobial agent in sausage, *food Microbiology* **25**, 207-2011.
16. **Cano J. H. & Volpato G. (2004).** Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *J Ethnopharmacol* **90**, 293-361.
17. **Capasso A. (2013).** Antioxidant action and therapeutic efficacy of *Allium sativum L* *Molecules* **18**, 690-700.

18. **Cardenas Rodriguez N., Huerta Gertrudis B., Rivera Espinosa L., Montesinos Correa H., Bandala C., Carmona Aparicio L. & Coballase-Urrutia E. (2013).** Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 1455-1476.
19. **Chaabi. (2008).** *African Journal of Biotechnology* **8(24)**, 7017-7027.
20. **Chang C., Yang M., Wen. & Chern J. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analysis* **10**, 178-182.
21. **Chevalier Auguste. (1938).** Livre: La Marjolaine vraie (*Majorana hortensis*) et sa culture, 204-205.
22. **Chu W. L., Lim Y. W., Radha krishnan A. K. & Lim P. E. (2010).** Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and alternative Medicine* **10(59)**, 2-8.
23. **Chung Y. K., Heo H., Kim E. K., Huh T. L., Lim Y., Kim S. K. & Shin D. H. (2001).** Inhibitory effect of ursolic acid purified from *Origanum majorana* L. on the acetylcholinesterase. *Mol. Cells* **11**, 137-143.
24. **Cowan N. M. (1999).** Plant product as antimicrobial agent. *Clinical Microbiology Reviews* **12(4)**, 564-582.
25. **Dacosta Y., 2003 :** les phytonutriments bioactifs. ED Yves Dacosta Paris ,317.
26. **Debry M, Jacquemin H. & Raza. (1971).** Travaux et documents de l'Orstom (paris),8.
27. **Dent M., Bursac Kovačević D. B., osiljkov T. & Dragović-Uzelac V. (2017).** Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L). Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Pierottijeva. Zagreb Croatia.
28. **Deshmane Dipti N., Chhaya H Gadgoli. & Ganesh V Halade. (2007).** Anticonvulsant effect of *Origanum majorana* L. *Pharmacologyonline* **1**, 7-64.
29. **Devasagayam T. B. A., Tilak J. C., Boloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S. & Lele R. D. (2004).** Free radical and antioxidants in human health. Current status and future prospects. *JAPI* **52**, 794-804.
30. **Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocher P. & Vidal N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* **97**, 654-660.
31. **Dubois J., Mitterand H. & Dauzat D. A. (2006).** Dictionnaire étymologique et historique du français – Larousse.
32. **Duran Bedolla J., Rodriguez M. H., Navor V. S., Arancibia S. R., Cerbon M. & Rodriguez M. C. (2013).** Oxidative stress: production in several processes and organelles during *Plasmodium* sp development. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2(2)**, 93-100.
33. **Ebrahimi N. S., Hadian J., Mirjalili M. H., Sonboli A. & Yousefzadi M. (2008).** Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food chemistry* **110**, 927-931.
34. **Favier A. (2003).** Le stress oxydant. Interêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Clinique*, 108-115.
35. **Fecka I. & Turek. (2007).** Determination of Water-Soluble Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage .Department of Pharmacognosy, Wrocław Medical University Wrocław, Poland. *Nankiera* **1**, 50-140.
36. **Ferguson L. R. (2001).** Role of plant polyphenols in genomic stability. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **475**, 89-111.
37. **Fernie W. T. (1994).** Medicinal plants and plante based medicines, Marjoram, John Wright and Sons, Bristol, 192-194.

38. **Freire J. M., Cardoso M. G., Batista L. R. & Andrade M. A. (2011).** Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume, chemical and antimicrobial characterization. *Braz J Med Biol Res* **13(2)**: 209-214.
39. **Gardés Albert M., Bonnefont Rousselot D., Abedinzadeh Z. & Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique. *Actualité Chimique*: 91-96.
40. **Ge M., O'Reilly A., Baillie N., Twentyman G., Sturt J., Fitzpatrick M. & Taylor T. (2008).** Vitamin C: Evidence, application and commentary. *Original Scientific Paper* **35(5)**, 312-318.
41. **Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J. M. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 1370-1373.
42. **Gérard D & François C. (2009).** Petit la rousse des plantes médicinales, 327-328.
43. **Gilles Figueredo. (2007).** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Thèse Doctorat.
44. **Hannan A., Karan S. & Chatterjee T. K. A. (2012).** Comparative Study Of In-Vitro Antioxidant Activity Of Different Extracts Of Areca Seed Collected From Areca Catechu Plant Grown In Assam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4(2)**, 420-427.
45. **Hem E., K. & Aligaferro A. (2002).** flavonoïdes antioxydants : chimie, métabolisme et structure-activité relation. *ships the journal of international biochemistry* **13**, 572-584.
46. **Huang D., Ou B. Prior R. L. (2005).** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **53**:1841-1856.
47. **Ietswaart J. H. A. (1980).** Taxonomic Revision of the genus *Origanum* (Labiatae). Leiden Botanical Series, Leiden University Press, The Hague, Netherlands **4**.
48. **Jayasena T., Poljakb A., Smytheb G., Braidya N., Münchd G. & Sachdeva P. (2013).** The role of polyphenols in the modulation of *sirtuins* and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Research. Reviews*.
49. **Jena N. R. (2012).** NA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Bioxi* **37(3)**, 503-517.
50. **Kazłowska M., Laudy A. E., Starosciak B. J., Napiorkowski A., Chomicz L. & Kazimierczuk Z. (2010).** Antimicrobial and antiprotozoal effect of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Acta Scientiarum polonorum-Hortorum. Cultus* (**9**), 133-141.
51. **Khaldi A., Meddah B., Moussaoui A. & Benmehdi H. (2012).** Screening phytochimique et effet antifongique de certains extraits de plantes sur le développement in vitro des moisissures. *European Journal of Scientific Research* **80(3)**, 311-321.
52. **Kim M. H., Bae S., Kim Y., Cho C., Kim S. J., Kim Y., Lee S., Kim. H., Hwang Y., Kang J. S & Lee W. J. (2013).** Vitamin C prevents the stress-induced damages on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through the down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- $\alpha$  and ROS production in Gulo(-/-) Vit C-Insufficient. *Free radical biology and medicine. J. freeradbiomed* **10**, 1016.
53. **Komaitis M. E. (1992).** Composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) *Food Chemistry* **45**, 117-118.
54. **Krishnakumar & Potty S. N. (2012).** Handbook of herbs and spices Central Plantation Crops *Research Institute*, (ICAR), India, 336-365.

55. **Kuka S., Tatarkova Z. & Kaplan P. (2012).** Oxidative damage to proteins and lipids during ageing. *ActaMedicaMartiniana* **12(1)**, 5-11.
56. **Lamina S., Ezema C. I., Theresa A. I. & Anthonia E. U. (2013).** Effects of free radicals and antioxidants on exercise performance. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2(2)**, 83-9.
57. **Lee K.W., Kim Y. J., Lee H. J. & Lee C. Y. (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry* **51**, 7292-7295.
58. **Lendvai B., Zelles T., Rozsa. B. & Vizi ES. (2002).** Vinca alkaloid exchanges morphological dynamics of dendritic neocortical Layer 2/3 pyramidal cells. *Brain Research Bulletin* **59(4)**, 257-260.
59. **Li H. B., Cheng K. W., Wong C. C., Fan K. W., Chen F. & Jiang Y. (2007),** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry* **102**, 771-776.
60. **Liochev S. I. (2013).** Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine* **60**, 1-4.
61. **Ma P., Wu Y., Zeng Q., Gan Y., Chen J., Ye X. & Yang X. (2013).** Oxidative damage induced by chlorpyrifos in the hepatic and renal tissue of Kunming mice and the antioxidant role of vitamin E. *Food and Chemical Toxicology* **58**, 177-183.
62. **Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E. & Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry* **89**, 411-420.
63. **Martha R. & Gutierrez P. (2012).** Inhibition of advanced glycation end-product formation by *Origanum majorana* in vitro and in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Evid Based Complement Altern Med* **1**, 1-8.
64. **Meda N. T. R., Bangou M. J., Bakasso S., Millogo Rasolodimby J. & Nacoulma O.G. (2013).** Antioxidant activity of phenolic and flavonoid fractions of *Cleome gynandra* and *Maerua angolensis* of Burkina Faso. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **3(2)**, 36-42.
65. **Mezziti Asma. (2009).** Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L. Étude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire magister.
66. **Miliauskas G., Venskutonis P. R. & Van Beek T. A. (2004).** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry* **85**, 231-237.
67. **Mohamed N., Yasmien S. H. & Nohir G. (2011).** Antimicrobial activity of water and ethanol *Majorana* (*Origanum majorana* L.) extract. *International Annual Scientific Conference*, 2350-2366.
68. **Mueller Harvey. (2006).** Unraveling the conundrum of tannins and health. *J. Sci. Food Agric.* **86(13)**, 2010-2037.
69. **Naif Obaid Al-Harbi. (2011).** Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. *J Med Plants Res* **5(23)**, 5479-5485.
70. **Pallauf K., Bendall J. K., Scheiermann C., Watschinger K., Hoffmann J., Roeder T. & Rimbach G. (2013).** Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food and Chemical Toxicology* **58**, 255-263.
71. **Papas A. M. (2008).** Vitamin E: A new perspective. *Nutri news* **9(1)**, 1-7.
72. **Paris R. & Moysse H. (1969).** Précis de matière médicale. ED Massou Paris.
73. **Pastre J. O. C. (2005).** Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 120.
74. **Pimple BP., Kadam P. V. & Patil M. J. (2012).** Comparative antihyperglycaemic and antihyperlipidemic effect of *Origanum majorana* extracts in NIDDM Rats. *Orient Pharm Exp Med*, **12(1)**, 41-50.

75. **Pinecemail J., Karine B., Karine C. & Jean Olivier D. (2002).** Mécanismes Physiologiques de la défense Antioxydante. Physiological Action of Antioxydant Defences. *Nutritio Clinique et métabolisme* **16(6)**, 233-239.
76. **Piquemal G. (2008).** Les flavonoïdes (enligne). Optioncom\_content & view article & id& Itemid, 215.
77. **Prerne. & Neeru Vasudeva. (2015).** *Origanummajorana* L. Phyto-pharmacological review. *Indian journal of natural products and resources* **6(4)**, 261-267.
78. **Proestos C., Lytoudi K., Mavromelanidou O. K., Zoumpoulakis P. & Sinanoglou V. J.(2013),** Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants* **2**, 11-22.
79. **QuézelP. & Santa. (1962).** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris. CNRS **(2)**, 1170.
80. **Rajesh K., Swamy A. H. M. V., Inamdar S. S., Joshi V. & Kurnool A. N. (2013).** Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanol extract of menthaarvensis leaves against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *International Journal of Pharm Tech Research* **5(2)**, 426-430.
81. **Regis Augusto Norbert Deuschle., Viviane Cecília Kessler Nunes Deuschle., Gabriela Bonfanti-Azzolin, Juliana Sorraila de Oliveira., Queli Cristina Bitencourt Sostisso., Jéssica dos Santos Goulart., Mariana Spanamberg Mayer., Roberta Cattaneo Horn. & Diego Pascoal Golle. (2018).** Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of *Origanum majorana* Against Oxidative Stress Biomarkers. *Journal of Agricultural Science* **10**, 12.
82. **Rezaie A., Mousavi G., Nazeri M., Jafari B., Ebadi A., Ahmadeh C & Habibi E. (2011).** Comparative study of sedative, pre-anesthetic and anti-anxiety effect of *Origanum majorana* extract with diazepam on rats. *J Biol Sci* **6(11)**, 611-614.
83. **Ribéreau Gayon P. (1982).** Notions générales sur les composés phénoliques, méthodes générales d'études des composés phénoliques. In composés des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 173-201.
84. **Rizk A. M. (1982).** Constituents of plants growing in Qatar fitotherrapia **52(2)**, 35-42.
85. **Rofi I A., Fatchiyah F., Rahayu P., Muhyi R. & Sumitro S. B. (2013).** Reactive oxygen species, NFlevels in tissue of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* **2(2)**, 143-147.
86. **Rochette L., Lorin J., Zeller M., Guilland J. C., Lorgis L., Cottin Y & Vergely C. (2013).** Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets. *Pharmacology & Therapeutics. J.pharmthera* **10**, 1016.
87. **Sanchez Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology* **8**, 121-137.
88. **Sanders T. & Emery P. (2003).** Molecular basis of human nutrition. Taylor & Francis **(7)**, 107.
89. **Savini I., Catani M. V., Evangelista D., Gasperi V. & Avigliano L. (2013).** Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. *Int. J. Mol. Sci* **14**, 10497-10538.
90. **Shacter E. (2000).** Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug metabolism reviews* **32(3&4)**, 307-326.
91. **Sharma N., Dubey N. K. & Sharma k. (2011).** Screening of insecticidal and antifungal activity of *Origanum majorana* oil against *Callosobruchus chinensis* L, and *Aspergillus* spp, *J Agric and BiolSci* **7(2)**, 223-227.



92. **Tang S. Y. & Halliwell B. (2010).** Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **394**,1-5.
93. **Tim T. P. C. & Lamb A. J. (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* **26**, 343-356.
94. **Trease E. & Evans W. C. (1987).** Pharmacognosy Tindall London: 61-62.
95. **Triantaphyllouk., Blekas G. & Boskou D. (2001).** Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **52(4)**, 313-317.
96. **Vagi., Rapavi., Hadolin M., VasarhelyinepEridi K., Balazs A., Blazovics A. & Simandi B. (2005).** Phenolic and Triterpenoid Antioxidants from *Origanum majorana* L. Herb and Extracts Obtained with Different Solvents. *J. Agric. Food Chem* **53(1)**, 17-21.
97. **Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**, 1-40.
98. **Xiang Q., Wang Y., Wu W., Meng X., Qiao Y., Xu L. & Liu X. (2013).** Carnosic acid protects against ROS/RNS-induced protein damage and upregulates HO-1 expression in macrophages. *Journal of Functional Foods* **5**, 362-369.
99. **Yang Y. & McClements D. J. (2013).** Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified  $\alpha$ -tocopherol acetate. *Food Chemistry* **141**, 473–481.
100. **Yazdanparast R. & Shahriyary. (2008).** comparative effects of *Artemisia dracunculoides*, *Saturejahortensis* and *origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. *Vasopharmacol* **48**, 32-37.
101. **Zhao Y., Dou J., Wu T. & AkberAisa H. (2013).** Investigating the Antioxidant and Acetylcholinesterase inhibition activities of *Gossypium hirsutum*. *Molecules* **18**, 951-962.
102. **Zhu Q., Qian Y., Zheng Z. P., Lo C., Chen F. & Wang M. (2012).** Natural polyphenols alleviated lipid peroxidation– induced modification on BSA. *Journal of functional*.

## Résumé

Les molécules douées d'activités biologiques d'origine naturelle devenant un centre d'attraction des recherches actuelles en agissant contre les radicaux libres qui peuvent être impliqués dans le développement de nombreuses maladies en provoquant des dommages aux différents constituants cellulaires.

*Majorana hortensis* est une plante qui appartient à la famille des lamiacées. L'objectif de cette étude est le dosage qualitatif des métabolites secondaires dans les feuilles de cette plante sur deux variétés l'une d'origine Égyptienne et l'autre vient de la Pakistan. Les tests phytochimiques réalisés ont permis de détecter les tanins, les alcaloïdes, les stérols et les saponosides et de montrer l'absence des coumarines et des anthocyanes chez les deux variétés et de mettre en évidence la présence des triterpènes chez la variété pakistanaise et leur absence chez l'autre variété. Les deux extraits méthanoliques obtenus par macération ont donné les rendements suivants **7,08%** pour l'extrait égyptien et **8,34%** pour l'extrait pakistanaise. Le dosage quantitatif des flavonoïdes et des polyphénols où la teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, elle est de **50,734±3,011µg EAG/mg** pour l'extrait Égyptien et de **54,76±0,398 µgEAG/mg** pour l'extrait Pakistanaise. Les flavonoïdes ont été évalués par la méthode utilisant AlCl<sub>3</sub>, la teneur en flavonoïdes est estimée à **36,96±1,7µgEQ/mg** et **27,36±0,49 µgEQ/mg** pour les extraits Égyptien et Pakistanaise respectivement.

Les résultats obtenus de l'activité antioxydante ont montré une bonne efficacité des extraits étudiés par la méthode de DPPH en enregistrant des IC<sub>50</sub> de l'ordre (**9,05 ± 0,416µg/ml**) et de (**5,284 ± 0,149 µg/ml**), respectivement pour l'extrait égyptien et Pakistanaise.

**Mots clés :** Composés phénoliques, Espèces oxygénées réactives (EOR), *Majorana hortensis*, activité antiradicalaire, activité antioxydante.

## Abstract

Molecules endowed with biological activities of natural origin becoming a center of attraction of current search by acting against free radicals that can be involved in the development of many diseases by causing damage to different cellular constituents.

*Majorana hortensis* is a plant that belongs to the family Lamiaceae. The objective of this study is the qualitative assay of secondary metabolites in the leaves of this plant on two varieties, one from Egyptian origin and the other from Pakistan. The phytochemical tests carried out made it possible to detect tannins, alkaloids, sterols and saponosides and to show the absence of coumarins and anthocyanins in both varieties and to demonstrate the presence of triterpenes in the Pakistani variety and their absence at the other variety. The two methanolic extracts obtained by maceration gave the following yields **7.08%** for EE and **8.34%** for EP. The second objective is the quantitative determination of flavonoids and polyphenols where the total polyphenol content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, it is **50,734 ± 3,011µg EAG/mg** for the Egyptian extract and **54,76 ± 0,398 µgEAG/mg** for the Pakistani extract. Flavonoids were evaluated by the method using AlCl<sub>3</sub>, the flavonoid content is estimated at **36.96 ± 1.7µgEQ/mg** and **27.36 ± 0.49 µgEQ/mg** for the Egyptian and Pakistani extracts respectively. The other objective of this study is the evaluation of the antioxidant activity of this plant. The antiradical activity was evaluated in vitro by the DPPH radical scavenging test. For both Egyptian and Pakistani varieties, the IC<sub>50</sub> values are **9.05 ± 0.416 µg / ml** and **5.284 ± 0.149 µg / ml**, respectively.

**Key words:** Phenolic compounds, reactive oxygen species (ROS), *Majorana hortensis*, antiradical activity, antioxidant activity.

## ملخص

لقد أصبحت الجزيئات الطبيعية ذات الوظائف الحيوية محل اهتمام الكثير من البحوث العلمية في الوقت الحالي لما لها من دور هام في تثبيط الجذور الحرة والتي يمكن ان تسبب في العديد من الامراض وذلك بتخريبها لمختلف مكونات الخلية.

الهدف من هذه الدراسة هو التقدير النوعي لهذه الجزيئات على مستوى اوراق نبات البردقوش (*Majorana hortensis*) الذي ينتمي الى عائلة النعناعيات (Lamiaceae) لنوعيتين الاولى من مصر والثانية من باكستان. الدراسات الفيتوكيميائية حول هذه النبتة مكنت من اثبات وجود بعض من هذه المركبات الثانوية: التانينات، الفلويديات، الستيرول والصابونويدات في كلا المستخلصين في حين غياب الكومارين والانتوسيان في كل من النبتتين ووجود التاربانويد في المستخلص الباكستاني وغيابه في المصري. تم استخراج المستخلصين بواسطة النقع مع التحريك وقدموا مردودا قدر ب: 7.08% بالنسبة للمستخلص المصري و 8.34% بالنسبة للباكستاني.

الهدف الثاني من دراستنا هو التقدير الكمي لجزيئات كثير الفينول والفلافونويدات بحيث تم الكشف عن البوليفينولات بواسطة folin-ciocalteu ووجدنا ان النوعية الباكستانية احتوت على 0.398±54.76 ميكروغرام مكافيء لحمض القاليك /ملغ والنوعية المصرية على 51.54±0.64 ميكروغرام مكافيء لحمض القاليك/ملغ. اما الفلافونويدات فقد تم الكشف عنها بواسطة AICI<sub>3</sub> وحصلنا على النتائج التالية 36.96±1.7 ميكروغرام مكافيء للكارسيتين/ ملغ و 27.36±0.49 ميكروغرام مكافيء للكارسيتين /ملغ لكل من النوعيتين المصرية والباكستانية على التوالي. كما تم قياس الوظيفة المضادة للاكسدة بواسطة اختبار تثبيط الجذر الحر DPPH بواسطة المستخلصين المصري والباكستاني فكانت النتائج كالتالي: 9.05±0.416 ميكروغرام /مل و 5.284±0.149 ميكروغرام /مل على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** جزيئات البوليفينول، البردقوش، الانواع المتفاعلة المؤكسدة، الوظيفة المضادة للاكسدة.